ADRIANA TONET MORENO

**Avaliação da variabilidade do candidato vacinal PspC
(*Pneumococcal surface protein C*) em isolados de
Streptococcus pneumoniae do Hospital Universitário da
Universidade de São Paulo**

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

São Paulo
2013

ADRIANA TONET MORENO

**Avaliação da variabilidade do candidato vacinal PspC
(*Pneumococcal surface protein C*) em isolados de
Streptococcus pneumoniae do Hospital Universitário
da Universidade de São Paulo**

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Eliane Namie Miyaji

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Moreno, Adriana Tonet.

Avaliação da variabilidade do candidato vacinal Pspc (Pneumococcal surface protein C) em isolados de *Streptococcus pneumoniae* do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo / Adriana Tonet Moreno. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Eliane Namie Miyaji.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de antígenos vacinais.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the variability of the vaccine candidate Pspc (Pneumococcal surface protein C) in *Streptococcus pneumoniae* isolates from the University Hospital of the University of São Paulo.

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Vacina 3. Pspc 4. Fator H 5. IgA secretório I. Miyaji, Profa. Dra. Eliane Namie II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB080/2013

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

Candidato(a): Adriana Tonet Moreno.

Título da Tese: Avaliação da variabilidade do candidato vacinal Pspc (Pneumococcal surface protein C) em isolados de *Streptococcus pneumoniae* do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

Orientador(a): Profa. Dra. Eliane Namie Miyaji.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Vacinas recombinantes contra *Streptococcus pneumoniae*" **protocolo nº 457/08**, sob a responsabilidade de Eliane Namie Miyaji, 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 **09/04/2008**.

We certify that the research entitled "Recombinant vaccines against *Streptococcus pneumoniae*", **protocol nº 457/08**, under the responsibility of Eliane Namie Miyaji, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of **04/09/2008**.

A CEUAIB autorizou a(s) mudança(s) solicitada(s) pela pesquisadora, ou seja, aditivo para espécie de camundongos.

Vigência do Projeto: 06/2008 – 05/2013 Centro de Biotecnologia	Nº de animais/espécie 300 camundongos Balb/c 120 camundongos C57BL/6
---	---

São Paulo, 18 de junho de 2010.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

*“Este trabalho eu dedicado aos meus avós,
Luiz Tonet (in memoriam) e Isolina Tonet, pelo amor,
incentivo e por me ensinar que o valor
da vida estão nas coisas simples”.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Eliane Miyaji, que com muita sabedoria me conduziu até as últimas linhas deste trabalho. Obrigada pela paciência de sempre, respeitar os meus limites e por demonstrar com suas atitudes como ser uma profissional e uma cidadã melhor. Obrigada por me mostrar como estudar é necessário e importante para manter uma carreira sólida, e também por me ajudar a descobrir meu caminho. Seus ensinamentos estarão presentes por toda a minha vida.

À Dra. Maria Leonor, agradeço por poder desfrutar de sua enriquecedora presença; por me mostrar que a vida de “gente grande” pode ser divertida, mesmo com todas as consequências, responsabilidades e cobranças. Obrigada pelas conversas/conselhos e por dividir comigo (na maioria das vezes) um lanchinho no final do dia! Léo muito obrigada!

Ao Dr. Paulo Lee Ho, pela oportunidade cedida para que esse projeto fosse realizado em seu laboratório, pelo incentivo e pelas “dicas” para que esse trabalho fosse desenvolvido da melhor forma.

À Dra. Daniela Ferreira, que com o convívio se mostrou fundamental na minha vida acadêmica/profissional e pessoal. Nossa amizade ficou ainda maior com toda essa nossa distância. Obrigada por me abrigar em sua casa durante minha estadia em Liverpool, você foi mais que uma amiga, foi uma irmã, me aconselhando, chamando minha atenção e me mostrando a verdadeira essência da vida. Amo você!

À Cintia Vadesilho, que durante o convívio se mostrou uma parceira indispensável, mas horas de fúria, mas principalmente nas horas de alegrias. Obrigada por sempre me ouvir e pelas risadas em nossas aventuras. Cada momento de perrengue que passamos juntas só fortaleceu nossa amizade e admiração que tenho por você.

Aos colegas de laboratório: Dra. Regiane Fávaro, Léo Kobashi, Fernanda Lima, Dr. Henrique Ramos, Dra. Swiany, Dr. Enéas, Dra. Jô, Aline, Dra. Juliana, Carolina, e Agatha. A todos vocês deixo meu muito obrigado!

As minhas chuchuzinhas: Liliane, Luciane e Carol, agradeço por todas as vezes que nossas conversas (lamentações) acabaram em risadas em uma mesa de bar. Obrigada pelo convívio ímpar que tive ao lado de vocês!

Agradeço à colaboração da Dra. Marina Martinez e a MSc, Silvia Santos, pelos isolados clínicos de *Streptococcus pneumoniae* cedidos e discussões para que esse projeto fosse desenvolvido com a melhor qualidade.

Ao Dr. Stephen Gordon, pela oportunidade de frequentar seu laboratório na LSTM, onde pude desenvolver meu potencial profissional e pessoal. Agradeço a todos da LSTM que tornaram essa experiência possível.

Ao Jorge, pelo carinho e prontidão com que sempre me auxiliou no manuseio do citômetro de fluxo e nas análises dos resultados e por tornar minhas tardes mais alegres com seu carinho inconfundível e com seus abraços mais calorosos.

Ao Dr. Ivan Nascimento, Dr. Leonardo Farias, Dra. Cibele e Dr. Henrique que, além da amizade, sempre me auxiliaram na rotina do laboratório, tirando as dúvidas mais corriqueiras.

Aos meus pais Sonia e Edson, agradeço à Deus todos os dias por ter tido vocês como meus pais! Vocês se mostraram parceiros, amigos em todos os momentos da minha vida. Participaram ativamente de todas as minhas decisões/escolhas, sempre me apoiando e me direcionando ao caminho do bem. Obrigada pelo amor e dedicação com que vocês me criaram, fazendo eu me tornar a pessoa que sou hoje, um ser humano que acredita que tudo o que deseja será conquistado com trabalho digno e com fé em si mesmo. Obrigada por tudo! Amo vocês!

Ao meu irmão André Moreno, um pentelho adorável que com o tempo se mostrou um grande amigo e cúmplice. Amo você seu tranqueira!

Aos meus tios, que sempre estiveram do meu lado me apoiando e sempre mostrando que o caminho do bem é sempre o melhor caminho. Amo vocês Família!

Aos meus amigos que de tão distantes parecem invisíveis, mas sempre se fizeram presentes em todos os momentos. A vocês deixo meu muito obrigado!

Aos meus mais novos colegas do “dia-a-dia” (GQ), Maurício, Arthur, Juliana, Mariana, Natalia e Karol, vocês entraram em minha vida aos 47 minutos do segundo tempo, quando a maior parte dessa tese já estava concluída, mas mesmo assim agradeço a paciência e compreensão que tiveram comigo.

Aos funcionários do Instituto Butantan, em especial à Izilda e Nidia, que foram mais que mães durante todos esses anos de convívio. Guardarei vocês em meu coração. E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, ao CNPq e à Fundação Butantan, pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

“Mas pra quem tem pensamento forte
o impossível é só questão de opinião”.
(Charlie Brown Jr.)

“De um lado a poesia o verbo a saudade
Do outro a luta, a força e a coragem pra chegar no fim
E o fim é belo incerto, depende e como você vê
O novo, o credo, a fé que você deposita em você e só”.
(O Teatro Mágico)

RESUMO

Moreno AT. Avaliação da variabilidade do candidato vacinal PspC (*Pneumococcal surface protein C*) em isolados de *Streptococcus pneumoniae* do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. [tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Streptococcus pneumoniae faz parte da microflora normal da nasofaringe humana, sendo uma das causas mais comuns de infecções do trato respiratório superior de indivíduos saudáveis. Ocasionalmente, as bactérias invadem nichos estéreis, causando as doenças graves, como pneumonia e meningite. As vacinas atualmente disponíveis são baseadas na resposta de anticorpos contra diferentes polissacarídeos capsulares, induzindo proteção sorotipo-específica contra infecções invasivas. *Pneumococcal surface protein C* (PspC) é um fator de virulência que atua durante a colonização da nasofaringe e na infecção invasiva, sendo considerado um importante antígeno para a composição de uma vacina proteica de ampla cobertura e baixo custo de produção. Estudos demonstraram que PspC medeia a interação de *S. pneumoniae* com o Fator H humano (FH), inibindo a ativação do sistema complemento, e com IgA secretório humano (sIgA), favorecendo a adesão da bactéria a células epiteliais. PspC foi classificado em 11 grupos, com base nas variações no gene. Nesse trabalho, foi determinado o grupo de PspC de treze linhagens de pneumococos isolados no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. A maior parte dos isolados clínicos avaliados possuem PspC do grupo 3, seguido do grupo 6. Camundongos BALB/c foram imunizados com três diferentes moléculas de PspC recombinantes (PspC3, PspC5 e PspC8) e os soros produzidos foram analisados em experimentos de *immunoblotting* e citometria de fluxo. A imunização com PspC3 induziu anticorpos capazes de reconhecer a maioria dos isolados de pneumococos por *immunoblotting* e citometria de fluxo. Na avaliação da interação de FH e sIgA com extratos de pneumococos, observamos que a maioria dos isolados testados apresentaram uma forte ligação com FH e uma interação mais fraca com sIgA por *immunoblotting*. Os ensaios de inibição da ligação de FH e sIgA utilizando IgG anti-PspC3 e IgG anti-PspC5 mostraram uma redução na ligação com o FH e sIgA. Nas bactérias intactas, essa inibição não foi observada na maioria dos isolados testados. A proteção contra a colonização foi avaliada através da imunização nasal de camundongos C57BL/6 com PspC3. Embora tenha sido observada uma redução na colonização da nasofaringe quando os animais foram desafiados com o isolado clínico HU23F, o grupo imunizado apenas com adjuvante também apresentou menor nível de colonização. Não foi possível, portanto, demonstrar a proteção mediada por anticorpos anti-PspC em camundongos, possivelmente por deficiências do modelo experimental. É importante ressaltar que a interação de PspC é específica para FH e sIgA humanos e que os diferentes modelos murinos de desafio com pneumococo verificam apenas a capacidade de anticorpos anti-PspC de opsonizar as bactérias e mediar a subsequente fagocitose, mas não levam em conta o bloqueio da função PspC.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Vacina. PspC. Fator H. IgA secretório.

ABSTRACT

Moreno AT. Evaluation of the variability of the vaccine candidate PspC (Pneumococcal surface protein C) in *Streptococcus pneumoniae* isolates from the University Hospital of the University of São Paulo. [Ph. D. thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Streptococcus pneumoniae colonizes the upper respiratory tract of healthy individuals, from where it can be transmitted to the community. Occasionally, bacteria invade sterile niches, causing serious diseases, such as pneumonia and meningitis. Currently available vaccines are based on the antibody response against several capsular polysaccharides, providing serotype-specific protection against invasive disease. Pneumococcal surface protein C (PspC) is a virulence factor that is important during the colonization and systemic phases of the diseases and is considered an important antigen for the development of a protein vaccine formulation with broad-coverage and low production cost. Previous studies have shown that *S. pneumoniae* is able to bind to both human Factor H (FH), an inhibitor of the alternative complement pathway, and human secretory IgA (slgA), via PspC. PspC was classified in 11 groups based on variations of the gene. In this work, the PspC group of thirteen strains isolated at the University Hospital of the University of São Paulo was determined. The majority of the strains expressed PspC from group 3, followed by group 6. BALB/c mice were immunized with three different recombinant PspC molecules (PspC3, PspC5 and PspC8) for the production of antibodies that were used for immunoblotting and flow cytometry analysis. Immunization with PspC3 induced antibodies that were able to recognize the majority of the pneumococcal isolates as analyzed by immunoblotting of whole-cell extracts and flow cytometry of intact bacteria. We have also evaluated the interaction of FH and slgA with pneumococcal extracts and the majority of the isolates tested showed a strong binding to FH and weaker interaction with slgA through immunoblotting. We have evaluated the inhibition of binding of FH and slgA to whole-cell extracts from pneumococci using anti-PspC3 IgG and anti-PspC5 IgG and we observed a reduction in binding of both FH and slgA. Inhibition in intact bacteria through flow cytometry was not observed for the majority of the isolates. The protection against nasopharyngeal colonization was evaluated by nasal immunization of C57BL/6 mice with PspC3. Although a reduction in nasopharyngeal colonization was observed when immunized mice were challenged with the clinical isolate HU23F, the group immunized only with adjuvant also showed lower levels of colonization. It was not possible, therefore, to show the protection mediated by immunization with PspC in this model. Importantly, the interaction of PspC is specific for human FH and slgA. Thus, the various murine models of pneumococcal challenge only check the ability of anti-PspC antibodies to opsonize the bacteria and to mediate subsequent phagocytosis, but do not take into account the blocking of PspC function.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Vaccine. PspC. Factor H. Secretory IgA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxa de incidência e mortalidade causada por <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
Figura 2 - Representação esquemática da superfície e fatores de virulência expostos na superfície de pneumococos.....	26
Figura 3 - Representação esquemática dos domínios contidos nas proteínas PspA e PspC dos clados A e B.....	28
Figura 4 - Representação esquemática dos grupos das proteínas PspC.....	30
Figura 5 - Representação esquemática interação entre PspC e seus receptores celulares, receptor polimérico Ig (pIgR) e fator H (FH).....	32
Figura 6 - Representação esquemática do vetor de expressão em <i>E. coli</i> pAE- <i>pspC</i>	40
Figura 7 - Esquema de imunização dos camundongos.....	44
Figura 8 - Análise da região consenso de ligação de FH após o alinhamento das sequências de PspC.....	52
Figura 9 - Análise da região consenso de ligação de slgA após o alinhamento das sequências de PspC.....	53
Figura 10 - Análise de restrição por eletroforese em gel de agarose 1% com os vetores pAE- <i>pspC</i> construídos.....	54
Figura 11 - Análise por SDS-PAGE 12% dos fragmentos de PspC purificados.....	55
Figura 12 - Análise por <i>immunoblotting</i> da reatividade dos soros anti-PspC3, anti-PspC5, anti-PspC8 e anti-PspA4 com os isolados de pneumococo.....	57
Figura 13 - Análise por <i>immunoblotting</i> da reatividade dos soros anti-PspA4, anti-PspC3 e anti-PspC5 com sobrenadante de cultura dos 13 isolados de pneumococo.....	59
Figura 14 - Análise por <i>immunoblotting</i> com sobreposição da interação de FH e slgA com os diferentes isolados de pneumococo.....	61
Figura 15 - Análise por <i>immunoblotting</i> com sobreposição da interação de FH e slgA com sobrenadante de cultura de pneumococo.....	63
Figura 16 - Análise por SDS-PAGE 12% da purificação de anticorpos IgG anti-Intimina, anti-PspC3 e anti-PspC5.....	65

Figura 17 - Análise por <i>immunoblotting</i> com sobreposição do bloqueio da ligação de FH e slgA por anticorpos IgG anti-PspC em isolados clínicos de pneumococos.....	67
Figura 18 - Análise densitométrica das bandas dos “blots” da Figura 17.....	68
Figura 19 - Ligação de anticorpos à superfície do pneumococo.....	70
Figura 20 - Ligação de FH à superfície do pneumococo.....	72
Figura 21 - Ligação de slgA à superfície do pneumococo.....	73
Figura 22 - Análise da ligação de IgG anti-PspC, FH e slgA à superfície das bactérias TIGR4, TIGR4 Δ pspA e TIGR4 Δ pspC.....	75
Figura 23 - Análise da ligação de IgG anti-PspC, FH e slgA à superfície das bactérias D39 e D39 Δ pspA.....	76
Figura 24 - Análise do bloqueio da ligação de FH à superfície de isolados clínicos de pneumococo.....	78
Figura 25 - Análise do bloqueio da ligação de FH à superfície das bactérias D39 selvagem e D39 Δ pspA.....	79
Figura 26 Análise do bloqueio da ligação de slgA à superfície dos isolados clínicos de pneumococo.....	80
Figura 27 - Avaliação da capacidade colonizadora dos isolados clínicos do HU-USP.....	81
Figura 28 - Indução de IgG anti-PspC3 e IgG anti-PspA5 em resposta à imunização nasal com PspC3+wP _{low} e PspA5+wP _{low}	82
Figura 29 - Avaliação da proteção em modelo de colonização da nasofaringe por pneumococo induzida pela imunização nasal (6 doses).....	84
Figura 30 - Avaliação da proteção em modelo de colonização da nasofaringe por pneumococo induzida pela imunização nasal (3 doses).....	85
Figura 31 - Sequência utilizada como molde para amplificação do gene <i>pspC3ΔFH</i>	87
Figura 32 - Análise por SDS-PAGE 10% do fragmento de PspC3 Δ FH purificado....	88
Figura 33 – Análise por <i>immunoblotting</i> da interação de FH e slgA com as proteínas recombinantes PspC3 e PspC3 Δ FH.....	89
Figura 34 - Indução de IgG anti-PspC em resposta à imunização subcutânea com as diferentes formulações.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isolados de <i>Streptococcus pneumoniae</i> do HU-USP.....	37
Tabela 2 - Linhagens de pneumococo.....	38
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificar <i>pspC</i> e <i>pspA</i>	38
Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados nas clonagens.....	39
Tabela 5 - Massa molecular e o valor de pI predito das proteínas recombinantes.....	42
Tabela 6 - Classificação do clado de PspA e do grupo PspC.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

Alum - Hidróxido de Alumínio
Amp - Ampicilina
BSA - Albumina Sérica Bovina
DO - Densidade Óptica
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetraacético
ELISA - “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
FBS - Soro Fetal Bovino
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
H₂O₂ - Água Oxigenada
His - Histidina
i.n. - Intranasal
Ig - Imunoglobulina
kb - Mil Pares de Bases
kDa - Quilo Dalton
M - Molar
m/V - Massa/Volume
ng - Nanograma
OPD - Ortofenilenodiamina
pb - Pares de Bases
PCR - Reação em cadeia da polimerase
s.c. - Subcutânea
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
V/V - Volume / Volume
X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-d-galactopiranosídeo
PS - Polissacarídeo capsular
Ply - Pneumolisina
PspA - Proteína de superfície de pneumococo A
pspA - Gene da proteína de superfície de pneumococo A
PsaA - Antígeno de superfície A de pneumococo
PspC - Proteína de superfície C de pneumococo
THY - Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
1.2 Epidemiologia	18
1.3 Vacinas e tratamentos	21
1.4 <i>Pneumococcal Surface Protein A</i>	26
1.5 <i>Pneumococcal Surface Protein C</i>	28
2 OBJETIVO GERAL	34
2.1 Objetivos específicos	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Lista de meios de cultura e soluções	35
3.2 Isolados de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	37
3.3 Tipagem de <i>pspA</i> e <i>pspC</i>	38
3.4 Clonagem de <i>pspC</i>	38
3.5 Expressão das proteínas recombinantes	40
3.6 Purificação das proteínas recombinantes	41
3.7 Imunização dos camundongos e produção do soro anti-PspC	42
3.7.1 Imunização subcutânea	42
3.7.2 Imunização nasal.....	42
3.8 Análise de indução de anticorpos por ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	44
3.9 Purificação de IgG do soro.....	45
3.10 Immunoblotting	46
3.10.1 Immunoblotting com os soros anti-PspC	46
3.10.2 Immunoblotting com sobreposição de FH e slgA	46
3.10.3 Bloqueio da ligação de FH e slgA por immunoblotting	47
3.11 Análise por citometria de fluxo	47
3.11.1 Análise de ligação de anticorpos IgG anti-PspC à superfície da bactéria.....	47
3.11.2 Análise da ligação de FH humano e slgA humana à superfície da bactéria intacta.....	48
3.11.3 Análise do bloqueio da ligação de FH e slgA à superfície da bactéria.	48
3.12 Desafio de colonização.....	49
4 RESULTADOS.....	50
4.1 Classificação do clado de PspA e do grupo PspC	50
4.2 Mapeamento dos domínios de ligação a FH e slgA.....	51
4.3 Clonagem de <i>pspC</i>	53

4.4 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	54
4.5 Produção de anticorpos policlonais em camundongos	55
4.6 Reatividade dos soros anti-PspC com os isolados de pneumococo	55
4.7 Ligação de FH e sIgA aos extratos proteicos dos isolados de pneumococo	60
4.8 Purificação de IgG anti-PspC	64
4.9 Ensaio de bloqueio da ligação de FH e sIgA por <i>immunoblotting</i>	65
4.10 Avaliação da ligação de anticorpos anti-PspC à superfície da bactéria intacta.....	69
4.11 Ligação de FH e sIgA à superfície da bactéria intacta.....	71
4.12 Ensaio de bloqueio da ligação de FH e sIgA por citometria de fluxo	77
4.13 Avaliação da capacidade dos isolados clínicos em colonizar a nasofaringe dos camundongos.....	81
4.14 Indução de anticorpos em animais imunizados com as proteínas recombinantes PspC3 e PspA5.....	82
4.15 Avaliação da proteção em modelo de colonização da nasofaringe dos camundongos imunizados.....	83
4.16 Clonagem, expressão e purificação de pAE- <i>pspC3ΔFH</i>	86
4.17 Avaliação da resposta humoral induzida pelas proteínas recombinantes por ELISA	89
5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	92
REFERÊNCIAS.....	99
APÊNDICES.....	108
APÊNDICE A- Alinhamento das sequências de PspC.	108
APÊNDICE B - Sequência utilizada como molde para amplificação do gene <i>pspC3ΔFH</i>	111
APÊNDICE C – Artigos publicados durante o doutorado (2010 a 2013).....	112
APÊNDICE D - Cross-reactivity of anti-pneumococcal surface protein C (PspC) antibodies with different strains and evaluation of inhibition of human complement factor H and secretory IgA binding via PspC.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae, comumente conhecido como pneumococo, tem sido um dos microrganismos mais estudados desde seu primeiro isolamento em 1881 (AlonsoDeVelasco et al., 1995). É um diplococo Gram-positivo encapsulado, anaeróbico aerotolerante (apresenta crescimento uniforme, suporta a presença de oxigênio, sem utilizá-lo em seu metabolismo), com uma espessa camada polissacarídica. Esta bactéria faz parte da microbiota normal da nasofaringe e orofaringe de seres humanos saudáveis. É o patógeno bacteriano causador de diversas doenças com alta mortalidade e morbidade, como meningite, sepse e bacteremia, além de ser a causa mais comum de otite média aguda e pneumonia.

A superfície do pneumococo é constituída por três estruturas distintas: membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica. O polissacarídeo capsular (PS) é o principal fator de virulência da bactéria, protegendo-a da fagocitose (Kadioglu et al., 2008). No entanto, esta estrutura é altamente variável com diferenças em sua composição e estrutura (Yother, 2004). A classificação dos isolados em diferentes sorotipos é baseada nessas diferenças de composição da cápsula polissacarídica. A técnica de Neufeld-Quellung é o método clássico de sorotipagem e baseia-se na capacidade do soro hiperimune específico de reagir com a cápsula bacteriana (McEllistrem, 2009).

1.2 Epidemiologia

Aspectos epidemiológicos da doença pneumocócica variam de um país a outro e ao longo do tempo, o que determina a necessidade de monitoramento constante dos sorotipos circulantes e do padrão de resistência antimicrobiana para uma melhor orientação terapêutica e definição de estratégias de controle (Dagan et al., 1997; Hausdorff et al., 2000; Yoshioka et al., 2011). Foi estimado que em 2000, houve 14,5 milhões de episódios de doenças graves causadas por pneumococo no mundo, causando 826.000 mortes em crianças abaixo de 5 anos, dos quais 91.000 eram crianças HIV positivas. Dentre as mortes das crianças HIV negativas, mais de

61% ocorreram em países africanos e asiáticos. Desse modo, infecções causadas por pneumococo seriam responsáveis por 11% de todas as mortes nessa faixa etária. A Figura 1A mostra a taxa estimada de incidência global de pneumonia por pneumococo em crianças menores de 5 anos e a Figura 1B apresenta a taxa de mortalidade por pneumococo em crianças HIV negativas (O'Brien et al., 2009). Dados epidemiológicos mais recentes mostram estimativa de ocorrência de 120 milhões de episódios de pneumonia em 2010, com progressão para episódios graves em 14 milhões de crianças menores de 5 anos. Em 2011, estimou-se que 1,3 milhões de episódio de pneumonia levaram à morte. Dentre as doenças que podem ser evitadas através de vacinação, *S. pneumoniae* é a maior causa de pneumonia severa (18,3%) e morte (32,7%), superando tanto *Haemophilus influenzae*, como o vírus influenza. A morbidade e mortalidade por pneumonia na infância estão regredindo, provavelmente devido à campanha mundial de imunização, mas é necessário agir globalmente e em nível nacional para acelerar essa redução (Walker et al., 2013).

Estudos realizados com dados de 2003 estimaram 34.217 internações por doenças pneumocócicas pelo Sistema Nacional de Saúde Brasileiro, contabilizando 0,1% de todas as hospitalizações no setor público (Novaes et al., 2011). Estimativas de 2005 mostram que as doenças causadas pelo pneumococo causam no Brasil mais de 40.000 mortes anuais, 300 casos de sepse, 370.000 casos de otite média e 150.000 casos de pneumonia, com custos associados de mais de US\$ 240 milhões (Constenla, 2008).

Figura 1 - Taxa de incidência e mortalidade causada por *Streptococcus pneumoniae*. (A) A incidência de doença pneumocócica em todo o mundo em crianças menores de cinco anos de idade, representada em casos por 100.000 crianças. (Ferreira et al., 2011). (B) Taxa de mortalidade causada por doenças pneumocócicas, representada em mortes por 100.000 crianças HIV negativas menores de 5 anos de idade (O'Brien et al., 2009).

Existem até o momento 93 sorotipos capsulares de pneumococo descritos, incluindo o sorotipo 11E identificado recentemente (Calix, Nahm, 2010). A maior parte das doenças pneumocócicas em crianças está associada a um número restrito de sorotipos, que varia de acordo com a região geográfica considerada (Dagan, 2004). Dados sugerem que 11 sorotipos mais comuns são responsáveis por 75% das infecções mundiais. Antes de 2000, os sorotipos pediátricos mais importantes nos Estados Unidos e na Europa eram 14, 6, 19 e 23F (Hausdorff et al., 2001; Jefferson et al., 2006), enquanto que nos adultos predominavam os sorotipos 3, 4, 7, 8 e 14 (Mangtani et al., 2003). Nos países em desenvolvimento, é comum encontrar também os sorotipos 1 e 5 em adultos (Mangtani et al., 2003). Na América Latina, são encontrados 13 sorotipos capsulares que correspondem a 85% dos isolados invasivos (Di Fabio et al., 2001; Laval et al., 2006).

1.3 Vacinas e tratamentos

Existem quatro vacinas disponíveis no mercado atualmente contra pneumococo, todas baseadas na indução de anticorpos anti-PS, com alta eficiência contra doença pneumocócica invasiva. Entretanto, há limitações quanto ao seu uso. A vacina de primeira geração é composta por PS de 23 sorotipos (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F - Pneumovax - Merck) e é pouco imunogênica, especialmente nos grupos mais suscetíveis (idosos e crianças). A resposta imune é independente de células T e, portanto, não induz memória imunológica.

As vacinas de segunda geração são as vacinas conjugadas a um carreador proteico. A primeira vacina de segunda geração é a 7-valente, composta por PS de 7 sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F - Prevenar – Wyeth) conjugados à toxina diftérica destoxificada geneticamente (CRM₁₉₇), licenciada nos Estados Unidos em 2000. Essa vacina mostrou-se eficiente na proteção contra infecções invasivas em crianças e apresentava, na época em que foi licenciada, cobertura entre 80-90% nos Estados Unidos, Canadá e Austrália, entre 70-75% na Europa e África, apenas 50% na Ásia (Hausdorff et al., 2005; Kaplan et al., 2002; Pelton et al., 2003) e 58% no Brasil (Brandileone et al., 2003). Estudos mais recentes mostraram que no Brasil a cobertura dessa vacina seria de 72% (Mantese et al., 2009). Devido à conjugação com um componente proteico, a vacina 7-valente induz uma resposta dependente de células T e memória, passando a ser imunogênica também em crianças. Além disso, a vacina confere proteção contra colonização para os sorotipos nela incluídos, levando à imunidade de “rebanho”, com uma queda nas doenças invasivas entre adultos não vacinados (Black et al., 2000; Dagan et al., 1997; Eskola, Anttila, 1999; Pelton et al., 2007; Whitney et al., 2003). A diminuição da incidência das doenças pneumocócicas entre indivíduos não vacinados foi dependente da faixa etária, com diminuição de 40% nos indivíduos entre 18-49 anos, 18% nos indivíduos entre 50-64 anos e de 37% nos indivíduos acima de 65 anos (Pilishvili et al., 2010).

No entanto, estudos sobre o impacto da implementação da vacina 7-valente reportaram o aumento nos casos de infecções causadas por sorotipos não presentes na vacina após alguns anos, verificando-se, assim, a substituição dos sorotipos prevalentes devido à pressão seletiva promovida pela vacina (Weinberger

et al., 2011). Estudos publicados em 2007 mostraram que após a implementação da vacina 7-valente, houve um aumento de doenças invasivas e otites média causadas por sorotipos de pneumococos não vacinais (Hicks et al., 2007; Singleton et al., 2007). Dados de 1998 a 2004 mostram que o sorotipo não vacinal 19A tornou-se a causa predominante de doença pneumocócica invasiva em crianças nos Estados Unidos (Hicks et al., 2007). Estudos realizados em Barcelona (Espanha), mostraram que doença pneumocócica causada pelo sorotipo 1 tornou-se comum após a introdução da vacina (Esteve et al., 2011).

Outro exemplo de mudança de sorotipo ocorreu com o aumento do sorotipo 6C, que foi descrito em 2007 (Park et al., 2007). O sorotipo 6C estava presente na era pré-vacina 7-valente, mas era rotineiramente sorotipado como 6A por causa de reatividade cruzada. Diversos estudos mostraram um aumento significativo na prevalência de doenças invasivas causadas pelo sorotipo 6C após a introdução da vacina 7-valente e uma diminuição na prevalência do sorotipo 6A (Leach et al., 2009; van Gils et al., 2010). Estes resultados mostram a necessidade da ampliação de cobertura de sorotipos e, de fato, novas vacinas conjugadas contendo 10 e 13 sorotipos foram licenciadas em 2009/2010 nos Estados Unidos e/ou Europa (Dagan et al., 2004; Klugman et al., 2003; Prymula et al., 2006; Scott et al., 2007).

A segunda vacina da segunda geração é a vacina 10-valente (Synflorix - GlaxoSmithKline Biologicals) que é constituída de três diferentes carreadores: proteína D de *H. influenzae* (conjugada individualmente ao PS dos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F), o toxoide tetânico (conjugado ao sorotipo 18C) e o toxoide diftérico (conjugado ao sorotipo 19F). A inclusão dos sorotipos 1, 5 e 7F na vacina elevaria a cobertura no Brasil para aproximadamente 86% (Mantese et al., 2009; Yoshioka et al., 2011). Devido à inclusão da proteína D, uma proteína de superfície de *H. influenzae* não tipável, havia expectativa de proteção contra otite causada por esta bactéria (Black et al., 2008). Esta vacina foi introduzida no Programa Nacional de Imunização no Brasil em abril de 2010. Sua utilização representa um grande ônus ao sistema público de saúde brasileiro devido ao alto custo. Em 2010, foram adquiridas pelo Ministério da Saúde 13 milhões de doses ao custo de aproximadamente R\$ 30,00 cada (<http://sna.saude.gov.br/noticias.cfm?id=4674>).

A terceira vacina de segunda geração é a vacina 13-valente (Prevenar 13 - Pfizer), que foi licenciada em substituição à vacina 7-valente e apresenta 6 sorotipos

adicionais (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F). Estima-se que essa vacina seria capaz de induzir uma proteção de 84% contra os isolados de pneumococos presentes na América Latina (Quadros, 2006) e no Brasil, aumentaria a cobertura para mais de 90% (Mantese et al., 2009; Yoshioka et al., 2011).

No ano de 2010, após a substituição da vacina 7-valente pela vacina 13-valente no calendário de imunização nos Estados Unidos, observou-se uma diminuição nas infecções pneumocócicas invasivas de 42% só no primeiro ano de sua implementação, em comparação com a média dos casos que ocorreram entre 2007 a 2009 (Kaplan et al., 2013). Estudos realizados por Miller e colaboradores, demonstraram que a eficácia da vacina 13-valente nos primeiros 15 meses após a sua introdução no Reino Unido e País de Gales foi de 78% (para as crianças menores de um ano de idade que receberam 2 doses) e de 77% (para as crianças maiores de um ano de idade que receberam 1 dose) (Miller et al., 2011). Um estudo realizado em 8 hospitais infantis nos Estados Unidos avaliando doenças invasivas comprovadamente causadas por pneumococo mostrou uma redução de 58% no isolamento do sorotipo 19A, que era a causa predominante de doença pneumocócica invasiva em crianças nos Estados Unidos após a implementação da vacina 7-valente. O isolamento dos sorotipos 7F e 3 também diminuiu substancialmente (54% e 68%, respectivamente). Além disso, foi observada redução nas infecções causadas pelos sorotipos 1 e 6C em 2011. Dentre os sorotipos não presentes na vacina 13-valente, os sorotipos mais isolados foram 33F, 22F, 12, 15B, 15C, 23A e 11. Em estudos preliminares no Alasca e em Massachusetts (Estados Unidos), também foi observada diminuição das doenças invasivas, após a introdução da vacina 13-valente no calendário de vacinação (Kaplan et al., 2013).

Existiam no Brasil, antes da introdução da vacina 10-valente, 10 sorotipos mais prevalentes, sendo que 45% das doenças eram causadas pelos sorotipos 14, 6B e 1. Os sorotipos 1 e 6B eram prevalentes em todas as idades; o sorotipo 14 causava mais infecções em crianças, enquanto os sorotipos 3 e 4 eram mais comuns em adultos (Brandileone et al., 2003). Em estudos realizados em Goiânia (GO) com crianças menores de 5 anos de idade, os sorotipos mais frequentemente encontrados na nasofaringe foram 14, 6B, 6A, 19F, 10A, 23F e 18C; os sorotipos 4 e 9V foram menos comuns e os sorotipos 1 e 5 foram raramente isolados (Laval et al., 2006). Em estudos realizados em Salvador (BA), os sorotipos prevalentes

encontrados em meningite pneumocócica foram 14, 3, 23F, 19F, 6B, 18 e 6A (de et al., 2011).

Na America Latina existe um projeto denominado Sistema Regional de Vacinas (SIREVA), que faz a vigilância epidemiológica do *S. pneumoniae* na região e é coordenado pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). Dentre os objetivos deste projeto está a análise da incidência dos sorotipos circulantes. No estudo realizado pelo SIREVA entre 2000 e 2005 com o isolamento de 8.993 cepas de pneumococos (36,4% das quais com diagnóstico de pneumonia), verificou-se que as cepas resistentes à penicilina correspondiam a 37,8% (Castaneda et al., 2009). A penicilina tem sido substituída por antibióticos mais caros e de amplo espectro. Entretanto, estudos retrospectivos e prospectivos envolvendo adultos e crianças demonstraram que os resultados do tratamento com penicilina das pneumonias pneumocócicas causadas por cepas resistentes não diferiam dos resultados obtidos com outros antimicrobianos, sugerindo que os pontos de corte utilizados para meningites não se aplicavam para pneumonia. Outros estudos multicêntricos confirmaram esses resultados (Yoshioka et al., 2011). De fato, em janeiro de 2008, o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) publicou novos pontos de corte para a susceptibilidade do pneumococo à penicilina (CDC, 2008). Atualmente, para doenças não meníngeas, cepas isoladas com CIM ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$ (concentração inibitória mínima) são consideradas sensíveis; com CIM = 4 $\mu\text{g/mL}$, com resistência intermediária; e resistentes, com CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$. Cepas isoladas de meningites são consideradas sensíveis se CIM $\leq 0,06$ $\mu\text{g/mL}$ e resistentes se CIM $\geq 0,12$ $\mu\text{g/mL}$ (CDC, 2008). Em estudo realizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) no período de 2003 a 2008 com 107 crianças com pneumonia pneumocócica, os sorotipos mais frequentes foram 14 (36,5%), 1 (16,7%), 5 (14,6%), 6B (6,3%) e 3 (4,2%). Desses isolados, 100 cepas (93,5%) de pneumococos foram sensíveis à penicilina, 7 cepas (6,5%) com resistência intermediária e nenhuma com resistência. Os resultados de sensibilidade à penicilina evidenciam que a opção terapêutica de escolha para o tratamento das pneumonias pneumocócicas continua sendo a penicilina. O grupo verificou alta taxa de sensibilidade para as cepas testadas para vancomicina, rifampicina, ceftriaxona, clindamicina, cloranfenicol e eritromicina (Yoshioka et al., 2011).

Embora não haja um problema sério de resistência de pneumococos à penicilina atualmente, a vacinação continua sendo a estratégia ideal para o controle das doenças pneumocócicas. O controle da infecção com antibiótico muitas vezes não evita a ocorrência de sequelas decorrentes de meningites, por exemplo. Embora as vacinas conjugadas tenham se mostrado extremamente eficientes no controle de doenças causadas por sorotipos vacinais, os vários estudos realizados após a implementação da vacina 7-valente mostram claramente que ocorreu um aumento de doença causada por sorotipos não vacinais. Diante da necessidade de uma vacina que não induza proteção sorotipo específica, vários grupos têm se dedicado ao desenvolvimento de uma vacina baseada apenas em antígenos proteicos protetores conservados em todos os isolados de pneumococo, administrados separadamente ou combinados. Uma vacina proteica eliminaria a dependência do sorotipo, induziria uma memória T-dependente protetora em crianças e apresentaria baixo custo para produção. Entre os antígenos proteicos de pneumococo mais estudados até o momento e aparentemente os candidatos vacinais mais promissores estão: pneumolisina (Ply), *pneumococcal surface protein A* (PspA), *pneumococcal surface adhesin A* (PsaA), neuraminidase (Nan) e *pneumococcal surface protein C* (PspC) (Tai, 2006) (Figura 2).

Figura 2 - Representação esquemática da superfície e fatores de virulência expostos na superfície de pneumococos. Na superfície dos pneumococos podem ser vistos fatores de virulência proteicos pertencentes a diferentes classes de moléculas. Encontram-se representadas as proteínas de tipo LPXTG PavB, PsrP e PfbA, assim como as subunidades do pilus-1 RrgA, RrgB e RrgC. De modo semelhante, as proteínas com ligação à colina PspA, PspC e LytA e as lipoproteínas PsaA, PiuA, PiaA, PpmA e SlrA podem ser vistas. Além disso, estão representadas na imagem as proteínas PavA, Enolase e GAPDH, assim como a proteína citosólica pneumolisina.
Fonte: Adaptado Gamez, Hammerschmidt, 2012.

1.4 *Pneumococcal Surface Protein A*

PspA é encontrada em todos os isolados de pneumococo e apresenta variabilidade estrutural e antigênica em cepas diferentes. PspA age na interação entre o patógeno e o hospedeiro interferindo na ativação e deposição de fatores do sistema complemento na superfície da bactéria (Ren et al., 2004; Tu et al., 1999). Foi demonstrado que PspA recombinante pode induzir uma resposta de anticorpo protetora em desafios letais em modelos animais (Briles et al., 2000; Briles et al., 2003). Além disso, foi descrito que PspA protege o pneumococo de morte por apolactoferrina em mucosas (Shaper et al., 2004). Estudos utilizando fragmentos truncados de PspA demonstraram que a porção C-terminal do domínio de α -hélice desta proteína (aminoácidos 167 a 288 do isolado Rx1) é capaz de ligar-se à lactoferrina humana, uma glicoproteína transportadora de ferro, presente em

secreções mucosas e liberada por leucócitos polimorfonucleares durante processos inflamatórios (Tai et al., 1993). A lactoferrina livre de metais, conhecida como apolactoferrina, possui efeito bactericida e bacteriostático contra várias bactérias, incluindo *S. pneumoniae*. O efeito bactericida está associado à desestabilização de carga da membrana, enquanto que o efeito bacteriostático é relacionado à sua capacidade de sequestrar Fe^{+2} das mucosas, tornando-o indisponível para a bactéria (Arnold et al., 1980).

Essa proteína apresenta um domínio na região C-terminal de ligação à colina, permitindo a ligação à parede celular da bactéria; ao lado desse domínio há uma região rica em prolina e na região N-terminal há um domínio de α -hélice que fica exposto na parede bacteriana (Yother, Briles, 1992) (Figura 3). Baseada na diversidade de sequência de aminoácidos da região variável localizada antes da região rica em prolina, denominada *clade defining region* (CDR), Hollingshead e colaboradores (Hollingshead et al., 2000) propuseram uma classificação para os isolados de pneumococo que os agrupa em 3 famílias: a família 1, subdividida nos clados 1 e 2; a família 2, subdividida nos clados 3, 4 e 5; e a família 3, de ocorrência bastante restrita com o clado 6. Como a reatividade cruzada entre as famílias é baixa, foi proposto que uma vacina baseada em PspA deveria conter ao menos um PspA pertencente à família 1 e um à família 2 para apresentar uma maior cobertura de proteção. Dados obtidos por nosso grupo mostraram que anticorpos gerados contra 2 fragmentos (PspA de clado 4 e de clado 5), de um total de 5 fragmentos analisados (PspAs de clados 1 a 5), foram capazes de reconhecer a maioria dos isolados de pneumococo em experimentos de *immunoblotting* (Darrieux et al., 2008). Os anticorpos gerados contra PspA de clado 4 e de clado 5 foram ainda capazes de mediar deposição de complemento *in vitro* em bactérias expressando PspAs dos clados 1 a 5, além de induzir proteção de camundongos contra desafio letal com bactérias expressando PspA de família 1 ou família 2 (Moreno et al., 2010).

1.5 Pneumococcal Surface Protein C

O *pspC* é um gene parálogo de *pspA*, com domínios estruturais similares ao PspA, incluindo a região de α -hélice, seguida pela região rica em prolina e a região de ligação à colina (Brooks-Walter et al., 1999) (Figura 3). Foi proposta uma divisão de PspC em dois clados: o clado A é composto de proteínas maiores e possuem a região semelhante à PspA, enquanto que o clado B é composto de alelos menores sem a região semelhante à PspA. Ao analisar 13 alelos, 3 deles foram agrupados no clado A e 10, no clado B (Brooks-Walter et al., 1999).

Figura 3 - Representação esquemática dos domínios contidos nas proteínas PspA e PspC dos clados A e B. Representação esquemática dos clados de PspC em comparação a molécula de PspA. Podemos observar as repetições dentro da região de α -hélice. A região hipervariável é indicado pela caixa contendo linhas em ziguezague. A região de PspC com homologia a região de α -hélice de PspA é demonstrada pelas linhas horizontais.
Fonte: Adaptado de Brooks-Walter (1999).

Posteriormente, Iannelli e colaboradores (Iannelli et al., 2002) conseguiram amplificar o locus *pspC* de 43 isolados de pneumococo e encontraram novas variações no gene, separando os alelos agora em 11 grupos. Foi encontrada uma única cópia de *pspC* em 37 isolados, enquanto que 2 cópias em *tandem* foram encontradas em 6 isolados. Um achado inesperado foi a presença de variantes na sequência de ancoramento à parede bacteriana: 32 proteínas apresentaram o domínio típico de ligação à colina, enquanto que as demais apresentaram o motivo

LPXTG, típico de outras bactérias Gram-positivas. PspCs apresentando a ligação à bactéria via colina foram classificados nos grupos 1 a 6, e aqueles cuja ligação é realizada através do motivo LPXTG foram classificados nos grupos 7 a 11 (Figura 4).

As proteínas com ancoramento através do domínio de ligação à colina (*choline-binding domain* - CBD) apresentam uma ligação não covalente à porção fosforilcolina dos ácidos tecóicos da parede celular e ácidos lipotecóicos da membrana plasmática na superfície bacteriana (Yother et al., 2004). Em contraste, as proteínas PspC cujo o ancoramento é via motivo LPXTG são ligadas covalentemente ao peptidoglicano bacteriano através da reação de transpeptidação da sortase (Voss et al., 2013).

Figura 4 - Representação esquemática dos grupos das proteínas PspC. Onze grupos estão representados e para cada grupo, um representante foi selecionado e está ilustrado: PspC1, PspC2, PspC3, PspC4, PspC5, PspC6, PspC7, PspC8, PspC9, PspC10 e PspC11. Blocos de sequências homólogas estão representados com a mesma cor. Todos os blocos estão representados em escala, com a exceção dos domínios de ligação à colina, que foram uniformizados. A sequência sinal está representada em preto e domínios de ancoramento em azul. As regiões ricas em prolina são representadas em verde; as diferentes tonalidades refletem as diferentes composições das sequências. Todas as outras cores e tonalidades referem-se aos domínios de α -hélice. O domínio de α -hélice em amarelo é repetido por duas vezes em cepas do grupo 5 (linha superior), que serve como padrão para o alinhamento dos demais grupos. Os grupos proteicos estão separados em dois blocos, dependendo do tipo de ancoramento encontrada: proteínas que têm a região de ligação à colina (azul escuro; grupos 1-6) acima e grupos de proteínas com a região de ligação do tipo LPXTG (azul claro; grupos 7-11) abaixo.

Fonte: Adaptado de Iannelli et al., 2002.

Diversos grupos descreveram PspC com diferentes nomes e demonstraram diferentes funções para a proteína. Foi denominado CbpA (choline-binding protein A ou C3-binding protein A), apresentando adesão a células epiteliais e endoteliais humanas ativadas (Rosenow et al., 1997) e ligação ao componente C3 do complemento (Cheng et al., 2000). A adesão mediada por CbpA parece envolver esta interação entre CbpA e C3 secretado por células epiteliais (Smith, Hostetter, 2000). PspC também foi descrito como SpsA (*S. pneumoniae* IgA binding protein), devido à ligação dessa proteína ao componente secretor da imunoglobulina A humana (Hammerschmidt et al., 1997) através de um motivo hexapeptídico conservado (YRNYPT) dentro da região de α -hélice de PspC (Hammerschmidt et al., 2000). A ligação de PspC ao receptor polimérico de Imunoglobulina (pIgR) parece

promover a invasão e migração do pneumococo através do epitélio da nasofaringe (Balachandran et al., 2002; Zhang et al., 2000) (Figura 5). PspC foi denominado ainda como Hic (factor H-binding inhibitor of complement), devido à ligação ao Fator H (FH), componente regulatório da via alternativa do sistema complemento (Dave et al., 2001; Janulczyk et al., 2000; Jarva et al., 2002). Hic corresponde a PspC do grupo 11 na classificação proposta por Iannelli e colaboradores (Iannelli et al., 2002), no qual a ligação à parede bacteriana ocorre através do motivo LPXTG. Foi descrito que a ligação de PspC ocorre através das regiões SCR ("short consensus repeats") 8-11 e 19-20 do FH (Hammerschmidt et al., 2007; Jarva et al., 2002) e que esta interação do FH com a superfície do pneumococo promove a adesão a células epiteliais e endoteliais (Hammerschmidt et al., 2007; Quinn et al., 2007). Foi demonstrado ainda que um motivo altamente conservado de 12 aminoácidos dentro da região de 89 aminoácidos N-terminal de PspC é necessário à ligação ao FH (ALNIKLSAIKTK) (Lu et al., 2006). PspC pode interagir ao mesmo tempo com FH e sIgA, já que os domínios de ligação a cada um destes componentes é distinto (Dave et al., 2004) (Figura 5). Foi descrito que PspC do grupo 4 é capaz de ligar-se ao inibidor de complemento C4-binding protein (C4BP) (Dieudonne-Vatran et al., 2009).

Estudos realizados recentemente identificaram PspC como sendo ainda uma proteína que interage com o domínio de ligação à heparina da vitronectina, fornecendo novas percepções sobre a adesão pneumocócica e a inibição do sistema complemento. A vitronectina está presente no plasma humano e é capaz de modular os sistemas complemento, fibrinolítico e de coagulação. Além disso, a vitronectina liga-se eficientemente à matrix extracelular de vários tecidos humanos, influenciando a adesão celular e diferenciação. Ensaio com FH e sIgA, demonstraram que FH não compete com a vitronectina para ligar-se a PspC, mas que sIgA inibe a interação da vitronectina com PspC em cerca de 70%. Esse estudo confirmou ainda que a vitronectina ligada a PspC é funcionalmente ativa, sendo capaz de inibir a cascata final do sistema complemento (Voss et al., 2013).

Figura 5 - Representação esquemática interação entre PspC e seus receptores celulares, receptor polimérico Ig (plgR) e fator H (FH). PspC interage através de motivos de hexapeptídeos presentes em dois domínios repetidos N-terminal R1 e R2 com os ectodomínios D3 e D4 do plgR, componente secretor livre (SC) ou IgA secretória. A proteína Hic, variante de PspC, liga-se ao FH por um motivo de ligação localizado em sua região N-terminal.

Fonte: Adaptado de (Hammerschmidt, 2006).

O papel de PspC na virulência do pneumococo e na colonização já foi demonstrado por diversos grupos em modelos murinos. Foi descrito um aumento dos níveis de mRNA de *pspC* em pneumococos recuperados após desafio intraperitoneal e intravenoso quando comparados aos níveis de bactérias após crescimento *in vitro*. Além disso, pneumococos pré-incubados com FH apresentaram maior proliferação *in vivo*, indicando que a interação entre PspC e FH contribui para a virulência da bactéria (Quin et al., 2005). Mutantes de *pspC* mostraram diminuição de colonização da nasofaringe, enquanto que nenhuma diferença foi observada em modelo de sepse por desafio intraperitoneal, pneumonia ou bacteremia (Balachandran et al., 2002; Rosenow et al., 1997). No entanto, a deleção de *pspA* e *pspC* levou a uma aceleração no *clearance* no modelo de bacteremia (Balachandran et al., 2002). Foi demonstrado ainda que PspC, em cooperação com PspA, inibe a imuno-aderência de bactérias a eritrócitos, diminuindo a transferência do

pneumococo dos eritrócitos a macrófagos o que, por consequência, reduz a fagocitose. Esse efeito foi correlacionado com a redução da deposição de complemento na superfície da bactéria pela presença dos dois fatores de virulência (Li et al., 2007). A imunização nasal com PspC levou à proteção de camundongos contra desafio intranasal de colonização (Balachandran et al., 2002), enquanto que a imunização parenteral de PspC com diferentes adjuvantes levou à proteção contra desafio intraperitoneal (Ogunniyi et al., 2001). A mistura dos antígenos PspA e PspC parece induzir níveis maiores de proteção contra desafio intraperitoneal (Ogunniyi et al., 2007a). Foi descrita ainda reatividade cruzada de anticorpos anti-PspC com PspA (Brooks-Walter et al., 1999; Dave et al., 2001), que ocorre provavelmente devido à presença de domínios com alta similaridade nestes dois antígenos.

Os dados obtidos em camundongos mostram que PspC possui potencial de ser utilizado como um antígeno vacinal capaz de proteger tanto contra a colonização quanto contra a infecção invasiva. No entanto, a variabilidade encontrada nos diferentes isolados mostra que seria necessária uma avaliação detalhada da capacidade das diferentes variantes alélicas em induzir proteção cruzada. De fato, um estudo realizado com o genoma completo de 240 isolados de pneumococos provenientes de uma linhagem resistente a múltiplos antibióticos mostrou que, além da região que contém os genes de síntese da cápsula, os *loci* que sofreram maior pressão seletiva com alta taxa de recombinação foram *pspA*, *pspC* e *psrP* (Croucher et al., 2011). Desse modo, para o desenvolvimento de uma formulação vacinal eficaz contendo PspC, é essencial selecionar a melhor molécula capaz de induzir anticorpos com uma ampla cobertura vacinal, o que reduziria problemas de recombinação e substituição de isolados mais prevalentes.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade do candidato vacinal PspC em isolados de *S. pneumoniae* do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP) para compor uma vacina com uma ampla cobertura de proteção contra pneumococos de diferentes sorotipos e que expressam diferentes grupos de PspC através da avaliação da reatividade cruzada de soros anti-PspC.

2.1 Objetivos específicos

1. Clonagem e sequenciamento do locus *pspC* de 13 isolados de pneumococo;
2. Construção dos vetores de expressão: pAE-*pspC5* e pAE-*pspC8*;
3. Expressão e purificação das proteínas recombinantes PspC3, PspC5 e PspC8;
4. Imunização dos camundongos para produção de soros anti-PspC;
5. Avaliação da reatividade cruzada dos soros anti-PspC em extratos proteicos e sobrenadantes de cultura de isolados de pneumococo por *immunoblotting*;
6. Avaliação da ligação dos anticorpos IgG anti-PspC na superfície das bactérias intactas por citometria de fluxo;
7. Avaliação da ligação do FH e sIgA a isolados de pneumococo por *immunoblotting* e citometria de fluxo;
8. Avaliação do bloqueio da ligação de FH e sIgA após a incubação prévia com anticorpos IgG anti-PspC por *immunoblotting* e citometria de fluxo;
9. Avaliação da proteção induzida por PspC no modelo de colonização da nasofaringe contra desafio com isolados de pneumococos expressando PspC de diferentes grupos.
10. Clonar, expressar e purificar a proteína PspC3 sem a região consenso de ligação à FH para avaliar seu impacto na imunogenicidade quando comparado à proteína PspC3 selvagem.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Lista de meios de cultura e soluções

1. Meios de Cultura:

1.1 Meio líquido LB: Triptona 1% (m/V), extrato de levedura 0,5% (m/V) e NaCl 1% (m/V).

1.2 Meio líquido LB -amp: meio LB e 100 µg/mL de ampicilina.

1.3 Meio líquido LB/ON: Triptona 1% (m/V) e extrato de levedura 0,5% (m/V).

1.4 Meio líquido LB/ON-amp: meio LB/ON e 100 µg/mL de ampicilina.

1.5 Meio sólido LB/ON-amp: meio LB/ON-amp e 1,6% de ágar (m/V).

1.6 Meio THY: Meio Todd-Hewitt (Difco) contendo 0,5% de extrato de levedura.

1.7 Ágar sangue: meio THY, 5% de sangue de carneiro (V/V) e 1,5% ágar (M/V).

1.8 Meio de estoque de pneumococo: meio THY contendo 20% de glicerol.

2. Solução X-Gal: 100 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranosídeo dissolvido em 2 mL de N, N-dimetil-formamida. Utilizou-se 80 µL por placa dessa solução.

3. Soluções para SDS-PAGE

3.1 Ficoll Dye 10x: 0,2% de Azul de bromofenol (m/V), 0,42% de Xileno cianol (m/V) e 50% de glicerol (V/V).

3.2 Solução tampão de amostra para SDS-PAGE 10x: 1 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 10% de SDS (m/V), 0,5% de Azul de bromofenol (m/V), 50% de glicerol (V/V) e 14,3 mol/L de β-mercaptoetanol.

3.3 Solução tampão Tris-glicina 5x: 1,5% de Tris base (m/V), 9,4% de glicina (m/V) e 0,5% de SDS (m/V). pH 8,3.

3.4. Solução corante de SDS-PAGE: 0,25% de “Comassie Brilliant Blue” (m/V), 40% de etanol (V/V) e 10% de ácido acético (V/V).

3.5 Solução descorante de SDS-PAGE: 30% de etanol (V/V) e 10% de ácido acético (V/V).

3.6 Solução secante de SDS-PAGE: 50% de etanol (V/V) e 10% de ácido acético (V/V).

4. Solução tampão de transferência de *immunoblotting*: Tris-glicina 1x e 20% de etanol (V/V).

5. Solução TBS-T 0,1%: 100 mM de Tris-HCl; pH 8,0; 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20.
6. Solução tampão de lise celular - DOC: 0,1% de desoxicolato de sódio, 0,01% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 0,15 M de citrato de sódio.
7. Soluções para purificação das proteínas recombinantes:
 - 7.1 Solução tampão de equilíbrio: 50 mM de Tris pH 6, 150 mM de NaCl e 5 mM de Imidazol.
 - 7.2 Solução tampão de lavagem: 50 mM de Tris pH 6, 150 mM de NaCl e 5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM de Imidazol.
 - 7.3 Solução tampão de eluição: 50 mM de Tris pH 6, 150 mM de NaCl e 300 mM de Imidazol.
 - 7.4 Solução tampão de diálise de proteínas: 10 mM de Tris pH 6, 20 mM de NaCl, 0,1% de glicina.
8. Soluções para ELISA:
 - 8.1 PBS (Solução tampão fosfato): 1,37 mol/L de NaCl, 27 mmol/L de KCl, 100 mmol/L de Na_2HPO_4 , 14 mmol/L de KH_2PO_4 , pH 7,4.
 - 8.2. PBS-T: PBS 1x e 0,05% de Tween 20 (V/V).
 - 8.3. Solução tampão PBS/BSA: PBS 1x e 1% de albumina bovina sérica.
 - 8.4 Solução tampão carbonato-bicarbonato: 50 mmol/L de Na_2CO_3 e 50 mmol/L de NaHCO_3 , pH 9,6.
 - 8.5. Solução tampão citrato-fosfato: 100 mmol/L de citrato de sódio e 300 mmol/L de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), pH 5,0.
 - 8.6. Solução substrato para revelação do ELISA: tampão citrato-fosfato pH 5, 0,04% de ortofenildiamina (Sigma) e 0,01% de H_2O_2 .
9. Solução para purificação do soro:
 - 9.1 Tampão de ligação: 20 mM de fosfato de sódio pH 7,0.
 - 9.2 Tampão de Eluição: 0,1 M de glicina pH 2,7.
 - 9.3 Tampão de neutralização: 1 M de Tris-HCl pH 9.
10. Anestésico para imunização: 0,2% de xilazina e 0,5% de quetamina em salina.
11. Anestésico para desafio: 0,2% de xilazina e 1% de quetamina em salina.
12. Uretano: dose letal de uretano igual a 15 mg de uretano por 10 g de massa corporal.

3.2 Isolados de *Streptococcus pneumoniae*

Isolados de pneumococos foram cultivados em placas de ágar sangue e posteriormente em meio líquido THY a 37 °C. As bactérias foram mantidas a -80 °C em THY contendo 20% de glicerol. Estes isolados foram cedidos gentilmente pela Dra. Marina Baquerizo Martinez (Serviço de Laboratório Clínico do HU-USP) onde os mesmos foram sorotipados por PCR multiplex (Dias et al., 2007; Pai et al., 2006) pela MSc. Silvia R. dos Santos. Entre todos os isolados cedidos, foram selecionados 13 isolados com base nos sorotipos presentes na vacina conjugada 13 valente (Tabela 1). O isolado St491/00 foi cedido gentilmente pela Dra. Maria Cristina C. Brandileone (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo), TIGR4 foi gentilmente concedido pelo Dr. Jeffrey N. Weiser (Universidade da Filadelfia - EUA) e a bactéria D39 foi cedida pelo Dr. David E. Briles (Universidade do Alabama - EUA). As bactérias mutantes, TIGR4 Δ pspA, TIGR4 Δ pspC e D39 Δ pspA (Tabela 2) foram geradas em nosso laboratório através da inserção/deleção usando os cassetes de resistência a eritromicina e espectinomicina, respectivamente, pela Dra Maria Leonor Sarno de Oliveira.

Tabela 1 - Isolados clínicos de *Streptococcus pneumoniae* do HU-USP.

Isolados	Sorotipo	Fonte de recuperação	Resistência a penicilina	Nomenclatura utilizada
HU26/07	1	Sangue	S	HU1
HU329/06	3	Sangue	S	HU3
HU160/07	4	Sangue	S	HU4
HU496/06	5	Sangue	S	HU5
HU614/05	6A*	Sangue	I	HU6A
HU780/05	6B*	Sangue	S	HU6B
HU336/07	7F*	Sangue	S	HU7F
HU473/06	9V*	Sangue	I	HU9V
HU625/05	14	Sangue	R	HU14
HU13/07	18C*	Sangue	S	HU18C
HU414/07	19A	CSF	I	HU19A
HU470/06	19F	Sangue	S	HU19F
HU368/06	23F	CSF	I	HU23F
St491/00#	6B	-	-	

S - sensível I, - sensibilidade intermediária, R – resistente, CSF – fluido cerebrospinal, * sorotipagem por reação de Quellung, # isolado a partir do qual o fragmento PspC3 foi clonado.

Tabela 2 - Linhagens de pneumococo.

Linhagens	Sorotipo	PspA	PspC
TIGR4 (wt)	4	PspA3	PspC3
TIGR4 $\Delta pspA$	4	-	PspC3
TIGR4 $\Delta pspC$	4	PspA3	-
D39 (wt)	2	PspA2	PspC3
D39 $\Delta pspA$	2	-	PspC3

wt = selvagem e Δ = gene *pspA* ou *pspC* deletado

3.3 Tipagem de *pspA* e *pspC*

A região N-terminal de *pspA* foi amplificada por PCR utilizando-se os oligonucleotídeos LSM12 e SKH2 (Tabela 3) (Hollingshead et al., 2000; Swiatlo et al., 1997) e o sequenciamento foi realizado com o oligonucleotídeo SKH2 diretamente do fragmento amplificado. O locus completo de *pspC* foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos IF43 e IF30 (Tabela 3) das regiões flangeadoras (Iannelli et al., 2002). O volume final da reação de PCR foi de 50 μ L, com uma concentração final de cada oligonucleotídeo de 2 μ M. A amplificação foi realizada utilizando-se a enzima *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e nas seguintes condições de temperatura: 94 °C – 4 minutos / 94 °C – 1 minuto / 54 °C – 1 minuto / 68 °C – 3 minutos / 68 °C – 7 minutos / 4 °C, realizando 30 ciclos de amplificação. Os fragmentos foram clonados em pGEM-T Easy (Promega) e o locus foi sequenciado utilizando-se os oligonucleotídeos M13F, M13R e oligonucleotídeos internos.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificar *pspC* e *pspA*.

Gene	Oligonucleotídeos
<i>pspC</i>	IF43 - 5'AATGAGAAACGAATCCTTAGCAATG3' IF30 - 5' AAGATGAAGATCGCCTACGAACAC3'
<i>pspA</i>	LSM12 - 5'CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT3' SKH2 - 5' CCACATACCGTTTTCTTGTTTCCAGCC3'

3.4 Clonagem de *pspC*

A região codificadora a porção N-terminal madura de PspC foi amplificada por PCR a partir dos plasmídeos contendo *pspC5* ou *pspC8*. A clonagem do fragmento *pspC3* (isolado St491/00) já havia sido realizada em nosso laboratório (Ferreira et

al., 2009). O fragmento *pspC5* codifica somente a região N-terminal em α -hélice, enquanto que os fragmentos de *pspC3* e *pspC8* codificam a região N-terminal em α -hélice mais a região rica em prolinas. Para a clonagem do gene *pspC3ΔFH* foi utilizado o fragmento *pspC3* como DNA molde e com os oligonucleotídeos adequados, a região consenso de ligação a FH foi retirada. A amplificação foi realizada utilizando-se a enzima *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e nas seguintes condições de temperatura: 94 °C – 4 minutos / 94 °C – 1 minuto / 54 °C – 1 minuto / 68 °C – 3 minutos / 68 °C – 7 minutos / 4 °C, realizando 30 ciclos de amplificação. Na Tabela 4 estão descritos os pares de oligonucleotídeos utilizados. O volume final da reação de PCR foi de 50 µL, com uma concentração final de cada oligonucleotídeo de 2 µM.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados nas clonagens.

Gene	Isolados	Oligonucleotídeos	pb
<i>pspC3</i>	St491/00	5'TAG GGATCC CATGCGACAGAGAACGAGA3' 5' CTGCAG TTATTGTGGTTGTTTCAGC3'	1203
<i>pspC5</i>	HU414/07	5'TAG GGATCC CATGCGACAGAGAACGAG3' 5'TAG GGTACC TTATTCTGGCTCATTACCTGCTTT3'	1077
<i>pspC8</i>	HU329/06	5'TAG GGATCC CATGCGACAGAGAACGAG3' 5'TAG GGTACC TTATGACTTCTTCGGCTTATT3'	510
<i>pspC3ΔFH</i>	St491/00	Frag1 5'TAG GGATCC CATGCGACAGAGAACGAGA3' 5'TAG TCTAGA TAAATTTGGGTATGTTTTCTTTTATC3'	147
		Frag 2 5'TAG TCTAGA TATTTGAATGGATTAAAAGAGA3' 5' CTGCAG TTATTGTGGTTGTTTCAGC3'	1020

pb: pares de base. Frag: Fragmento. A sequência de aminoácidos em vermelho: sítio de restrição BamH I; em azul: sítio de restrição Pst I; em roxo Kpn I e em verde Xba I.

Os fragmentos amplificados pela reação de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o Kit GFX DNA and Gel Purification (GE-Healthcare). Estes fragmentos purificados foram utilizados na reação de ligação no vetor pGEM-T-Easy (Promega). As reações de ligação foram mantidas a 4 °C durante 16 horas e utilizadas para transformar *Escherichia coli* DH5 α , cuja competência foi obtida pelo método de cloreto de cálcio (Sambrook, 1989). As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-amp contendo X-Gal para seleção de colônias brancas. As extrações de DNA plasmidial das colônias transformadas foram realizadas com o kit de minipreparações GFXTM (GE-Healthcare). A presença do inserto foi confirmada por análise de restrição (utilizando as enzimas mostradas na Tabela 4) e a sequência determinada em sequenciador

automático ABI Prism 3100 (PE Applied Biosystem). Os plasmídeos obtidos pGEM-T-*pspC5*, pGEM-T-*pspC8* e pGEM-T-*pspC3ΔFH*, foram então digeridos com as respectivas enzimas. Essas amostras digeridas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas de tamanho correspondente ao esperado, contendo o inserto, foram cortadas e purificadas. Esses insertos foram clonados no vetor de expressão em *E. coli* pAE-6xHis, que possui 6 resíduos de histidina que são expressos em fusão com a porção N-terminal da proteína, possibilitando sua purificação em coluna quelante de Ni^{2+} (Ramos et al., 2004). *E. coli* DH5α foi transformada com o produto dessa ligação e os plasmídeos foram isolados por minipreparações, originando os vetores pAE-*pspC5*, pAE-*pspC8* e pAE-*pspC3ΔFH* (Figura 6).

Figura 6 - Representação esquemática do vetor de expressão em *E. coli* DH5α pAE-*pspC*. Este vetor permite a expressão de proteínas recombinantes sob controle do promotor do fago T7 (P_{T7}). $T7\text{ term}$: terminador de transcrição de fago T7; $F1\text{ Ori}$: origem de replicação para fago T7; Amp^R : gene de resistência à ampicilina; $ColE1$: origem de replicação em *E. coli*.

3.5 Expressão das proteínas recombinantes

E. coli BL21 (Si) competentes (Invitrogen) foram transformadas com os vetores pAE-*pspC3*, pAE-*pspC5*, pAE-*pspC8* e pAE-*pspC3ΔFH* e crescidas a 30 °C durante 16 horas. A expressão da T7 polimerase nesta linhagem encontra-se sob o

controle do promotor induzível por choque osmótico pro-U, enquanto que a expressão do gene clonado em pAE-6xHis está sob controle do promotor T7. Quatro colônias resistentes à ampicilina foram inoculadas em 5 mL de meio LB/ON-amp e crescidas a 30 °C durante 16 horas. Esses inóculos foram diluídos na proporção de 1:30 nesse mesmo meio em um volume final de 5 mL. O crescimento dessas culturas foi acompanhado até a densidade óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) atingir aproximadamente 0,6, quando foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada amostra (alíquota não induzida) e nos 4 mL restantes foi adicionado NaCl em uma concentração final de 300 mM para induzir a expressão. Após 3 horas de indução, retirou-se novamente uma alíquota de 1 mL (alíquota induzida). Todas as alíquotas foram centrifugadas e as células foram ressuspensas com tampão SDS-PAGE 1X. As alíquotas foram aquecidas a 96 °C por 10 minutos e separadas em eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 10%) para analisar a expressão das proteínas antes e após a indução.

3.6 Purificação das proteínas recombinantes

Para realizar a expressão em maior escala, os clones com os maiores níveis de expressão foram crescidos em um volume de 300 mL em meio LB/ON-amp e induzidos no mesmo protocolo de indução com NaCl (300 mM) por 3 horas. As células foram centrifugadas a 3200 *g* durante 15 minutos, ressuspensas em 30 mL de tampão de equilíbrio e lisadas no aparelho French Press (1500 psi). As células lisadas foram centrifugadas a 12900 *g* por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e filtrado. A purificação a partir da fração solúvel foi realizada por cromatografia de afinidade ao Ni^{+2} . Após a lise celular, o sobrenadante foi adsorvido à coluna previamente carregada com 300 mM de $NiSO_4$ e equilibrada com 20 mL do tampão de equilíbrio. Lavagens foram realizadas com 50 mL do tampão de lavagem (5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM de Imidazol) e as proteínas foram recuperadas com o tampão de eluição (300 mM e 600 mM de Imidazol). Após a cromatografia, as frações coletadas foram separadas e analisadas em SDS-PAGE 10% e em seguida dialisadas em solução tampão de diálise. Essa solução foi deixada sob agitação constante por 16 horas a 4 °C. A dosagem das proteínas recombinantes foi determinada pelo método de Bradford (Protein Assay kit-Biorad) utilizando BSA

como padrão. As proteínas foram estocadas a -20 °C. Na Tabela 7, podemos observar a massa molecular e o pI predito das proteínas.

Tabela 5 - Massa molecular e o valor de pI preditos das proteínas recombinantes.

Proteína	Massa Molecular (kDa)	pI
PspC3	46,3	8,4
PspC5	41,3	5,5
PspC8	20,2	9,1
PspC3ΔFH	45,3	8,6

3.7 Imunização dos camundongos e produção do soro anti-PspC

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB, protocolo n° 457/08). Tanto as imunizações pela via de mucosa quanto o modelo de colonização da nasofaringe foram realizados em colaboração com a Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

3.7.1 Imunização subcutânea

Camundongos BALB/c fêmeas de 5 a 7 semanas de idade adquiridos do Biotério Central do Instituto Butantan foram imunizados pela via subcutânea com 5 µg de proteína recombinante, utilizando-se hidróxido de alumínio (50 µg Al⁺³) como adjuvante (grupos com 6 animais). As imunizações foram feitas em três doses com intervalo de 7 dias (Regime de imunização 1), como indicado na Figura 7A. Os soros dos camundongos imunizados foram coletados por punção retroorbital, 15 dias após a última dose.

3.7.2 Imunização nasal

Para a imunização nasal, o lipopolissacarídeo (LPS) de cada preparação de proteína recombinante foi removido através de um protocolo previamente descrito (Aida, Pabst, 1990). Foram adicionados 10 µL de Triton® X-114 a 1 mL das preparações das proteínas e, em seguida, as soluções foram sujeitas à forte

agitação em vórtex e incubadas em gelo por 5 minutos. As amostras foram novamente agitadas em vórtex e incubadas a 37 °C por 5 minutos. Após centrifugação a 37 °C por 30 segundos a 15700 g, a fase aquosa foi coletada e o protocolo foi repetido por mais 4 vezes. Após este procedimento, as proteínas foram estocadas a 4 °C.

Camundongos C57BL/6 fêmeas de 5 a 7 semanas, adquiridos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), foram utilizados nos ensaios de desafio de colonização da nasofaringe com imunização nasal. Grupos de 6 animais foram imunizados com 3 doses com intervalo de quinze dias entre as doses. Cada dose constituiu de 2 imunizações com intervalo de 3 dias entre elas, totalizando 6 imunizações (Regime 2 de imunização - Figura 7B). O Regime 3 de imunização constitui de 3 doses com intervalo de quinze dias entre as doses, totalizando 3 imunizações (Figura 7C).

Foi escolhido como adjuvante a vacina pertussis celular “low” (wP_{low} , com menor conteúdo de LPS) produzida pelo Instituto Butantan. Essa vacina já havia sido avaliada pelo nosso grupo como adjuvante nasal e apresentou bons resultados, como altos níveis de anticorpos e proteção contra o desafio nasal (Oliveira et al., 2010). Os grupos de camundongos receberam wP_{low} , PspC3+ wP_{low} ou PspA5+ wP_{low} . Cada dose de vacina constituiu de 5 ug de proteína recombinante despirogenizada por animal. Já o volume utilizado do adjuvante foi determinado como sendo 1/8 da dose da vacina aplicada em humanos, que equivale à dose da vacina pertussis aplicada em camundongos nos testes de eficácia nos lotes produzidos no Instituto Butantan. Para cada imunização, os camundongos foram anestesiados com 200 µl de anestésico para imunização pela via intraperitoneal e foram inoculados 10 µl de cada formulação vacinal na mucosa nasal, com auxílio de uma micropipeta.

Os soros dos camundongos imunizados foram coletados por punção retroorbital, incubado por 30 minutos a 37 °C e em seguida por 16 horas a 4 °C. O material foi então centrifugado a 1200 g por 10 minutos a 4 °C. O soro foi coletado e conservado a -20 °C.

Figura 7 - Esquema de imunização dos camundongos.

3.8 Análise de indução de anticorpos por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Micro placas de 96 poços com fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram revestidas com solução de proteínas recombinantes (1 $\mu\text{g/mL}$) em tampão Carbonato-Bicarbonato e mantidas a 4 °C por 16 horas. Em seguida, as placas foram mantidas a 37 °C por 30 minutos e lavadas três vezes com PBS-T. Os bloqueios foram feitos com leite desnatado 10% em PBS, a 37 °C por 30 minutos. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Diluições seriadas do soro dos camundongos imunizados foram adicionadas em cada poço das placas em PBS/BSA 1%, seguindo-se uma incubação a 37 °C por 1 hora e mais três lavagens com PBS-T. A seguir, anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Southern Biotech) diluído em PBS/BSA foi adicionado nas placas seguindo-se uma incubação a 37 °C durante 1 hora. Após essa incubação, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T. Os

anticorpos foram detectados através da adição do substrato OPD. As reações foram interrompidas com 1,25 M de H_2SO_4 e a absorbância a 492 nm ($A_{492 \text{ nm}}$) foi determinada em leitor de ELISA (Labsystems). A concentração de anticorpo foi determinada a partir de uma curva padrão obtida com IgG de camundongo (Southern Biotech), utilizando-se uma concentração inicial de 500 ng/mL. A análise estatística das diferenças das concentrações de anticorpos entre os grupos foi realizada pelo teste T de Student ou ANOVA, utilizando-se o programa GraphPad Prism5.

3.9 Purificação de IgG do soro

A partir dos soros de camundongos imunizados pela via subcutânea com as proteínas recombinantes, IgG anti-PspC3 e IgG anti-PspC5 foram purificadas por afinidade em coluna de proteína G-sepharose. Como controle negativo, foi purificado também o soro dos camundongos imunizados com a proteína recombinante Intimina (proteína de superfície de *E. coli* enteropatogênica – EPEC). O soro anti-Intimina foi cedido gentilmente pela Dra. Patricia Cristina Duarte Ferreira. Os soros foram diluídos em tampão de ligação na proporção 1:10. Após a diluição, o soro foi adsorvido à coluna HiTrap Proteína G HP de 1 mL (GE Healthcare) e equilibrado com 20 mL do tampão de ligação. A lavagem foi realizada com 10 mL do mesmo tampão e IgG foi recuperada com o tampão de eluição. Após a purificação, nas frações coletadas durante a eluição (1 mL cada) foram adicionados 200-300 μL de tampão neutralizante. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12% e em seguida dialisadas em PBS sob agitação constante por 16 horas a 4 °C. As amostras foram dosadas para determinar a concentração de IgG anti-PspC por ELISA e estocadas a -20 °C.

3.10 Immunoblotting

3.10.1 Immunoblotting com os soros anti-PspC

Os isolados de pneumococo foram cultivados em meio líquido THY até $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$. O precipitado celular foi lisado com tampão de lise - DOC e incubado a 37°C por 10 minutos (Ren et al., 2003). Os extratos proteicos, previamente quantificados pelo método de Bradford (15 µg de proteína total), ou 50 µl do sobrenadante de cultura foram separados em SDS-PAGE 10% e transferidos para membrana de nitrocelulose. PspC foi detectada através da incubação das membranas com os diferentes soros anti-PspC (1/1000) ou soro anti-PspA4 (Moreno et al., 2010) por 2 horas e em seguida, com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (1/1000) por 1 hora. A detecção foi realizada com o kit de quimioluminescência ECL plus (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

3.10.2 Immunoblotting com sobreposição de FH e slgA

Para avaliar a ligação do FH humano aos extratos de pneumococo, foi realizado um *immunoblotting* com sobreposição (Lu et al., 2006). Os extratos proteicos foram transferidos para membranas de nitrocelulose (15 µg de proteína total ou 50 µl do sobrenadante de cultura) e incubados em solução de PBS-T com 5% de leite desnatado e 0,04 µg/mL de FH humano (Sigma-Aldrich) por 16 horas a 4°C. As membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com PBS-T, seguindo-se incubação com anticorpo de cabra anti-FH humano (Calbiochem - 1/2500) por 1 hora. Em seguida, foi realizada incubação com anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich - 1/5000) por 1 hora e a detecção foi realizada com o kit de quimioluminescência ECL plus (GE Healthcare). Também foi avaliada ligação de slgA humana como descrito para o ensaio de FH, utilizando-se 0,4 µg/mL slgA humana (Sigma-Aldrich) e anticorpo de cabra anti-slga humana (Sigma-Aldrich - 1/2000).

3.10.3 Bloqueio da ligação de FH e sIgA por immunoblotting

Os extratos proteicos, previamente quantificados pelo método de Bradford, foram separados em SDS-PAGE 10% (2,5 µg de proteína total. Foi utilizada uma menor concentração de extrato proteico para melhor visualização das bandas quando comparada ao ensaio de sobreposição item 3.10.2). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas em solução de PBS-T com 5% de leite desnatado por 16 horas a 4 °C. As membranas foram incubadas durante 4 horas com 1 µg/mL IgG anti-Intimina, IgG anti-PspC3 ou IgG anti-PspC5 purificados em tampão PBS-T contendo 5% de leite desnatado. IgG produzido após imunização com a proteína Intimina recombinante de *E. coli* enteropatogênica – EPEC, foi utilizado como controle negativo. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com PBS-T para posterior incubação em solução de PBS-T com 5% de leite desnatado e 0,04 µg/mL de FH humano (Sigma-Aldrich) por 16 horas a 4 °C. As membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos com PBS-T seguindo-se incubação com anticorpo de cabra anti-FH humano (Calbiochem - 1/2500) por 1 hora. Em seguida, foi realizada incubação com anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich - 1/5000) por 1 hora e a detecção foi realizada com o kit de quimioluminescência ECL plus (GE Healthcare). Também foi avaliado o bloqueio da ligação de sIgA humana como descrito para o ensaio de FH, utilizando-se 0,4 µg/mL sIgA humana (Sigma-Aldrich) e anticorpo de cabra anti-sIgA humana (Sigma-Aldrich - 1/2000).

A densidade de cada banda foi determinada através do programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e a densidade relativa foi calculada em relação aos “blots” incubados previamente com o controle IgG anti-Intimina.

3.11 Análise por citometria de fluxo

3.11.1 Análise de ligação de anticorpos IgG anti-PspC à superfície da bactéria

Os isolados de *S. pneumoniae* foram descongelados, semeados em ágar sangue e incubados a 37 °C durante 16 horas. Essas bactérias foram inoculadas em meio THY e cultivadas até $DO_{600\text{ nm}} = 0,4-0,5$ ($\sim 10^8$ UFC/mL). Esses cultivos foram

centrifugados a 2000 *g* durante 5 minutos e lavados duas vezes com tampão PBS 1x. As bactérias foram incubadas com 1 µg de IgG anti-PspC previamente purificado (volume final de 100 µL por reação) durante 30 minutos a 37 °C e novamente lavadas mais duas vezes com PBS 1x. Seguiu-se a incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (1/1000 – Sigma-Aldrich) por mais 30 minutos no escuro e no gelo. Após duas novas lavagens, as amostras foram fixadas com 2% de paraformaldeído e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo com auxílio do aparelho FACSCalibur (BD Biosciences). Foram contados 10.000 eventos e a mediana total da fluorescência das bactérias foi utilizada para comparação entre os grupos.

3.11.2 Análise da ligação de FH humano e slgA humana à superfície da bactéria intacta

Estoques congelados de *S. pneumoniae* foram cultivados conforme o item 3.11.1, centrifugados a 2000 *g* durante 5 minutos e lavados duas vezes com PBS 1x. As bactérias foram incubadas com 1 µg/mL de FH humano (volume final de 100 µL por reação) durante 45 minutos à temperatura ambiente e depois lavadas mais duas vezes com PBS 1x. Seguiu-se a incubação com anticorpo de cabra anti-FH humano (1/100 - Calbiochem) por mais 45 minutos à temperatura ambiente. Após duas novas lavagens, as amostras foram incubadas com anti-IgG de cabra conjugado a FITC (1/100 - Sigma-Aldrich). Finalmente, foi realizada fixação em 2% de paraformaldeído e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo. Para a análise da ligação de slgA humana à superfície da bactéria, foi seguido o protocolo descrito para a ligação de FH, utilizando-se 30 µg/mL de slgA humana (Sigma-Aldrich) e anticorpo de cabra anti-slga humana (1/500 - Sigma-Aldrich).

3.11.3 Análise do bloqueio da ligação de FH e slgA à superfície da bactéria.

Estoques congelados de *S. pneumoniae* foram cultivados conforme o item 3.11.1, centrifugados a 2000 *g* durante 5 minutos e lavados duas vezes com PBS 1x. As bactérias foram incubadas com 1 µg de anticorpo IgG anti-Intimina, IgG anti-PspC3 ou IgG anti-PspC5 (volume final de 100 µL por reação) durante 30 minutos a

37 °C e novamente lavadas mais duas vezes com PBS 1x. Seguiu-se a incubação com 1 µg/mL de FH humano (volume final de 100 µL por reação) durante 45 minutos à temperatura ambiente e depois, mais duas lavagens com PBS 1x. Em seguida, as bactérias foram incubadas com anticorpo de cabra anti-FH humano (1/100 - Calbiochem) por mais 45 minutos à temperatura ambiente. Após duas novas lavagens, as amostras foram incubadas com anti-IgG de cabra conjugado a FITC (1/100 - Sigma-Aldrich). Após duas novas lavagens, as amostras foram fixadas com 2% de paraformaldeído e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo. Para a análise do bloqueio da ligação de slgA humana à superfície da bactéria, foi seguido o mesmo protocolo descrito para FH, utilizando-se 30 µg/mL de slgA humana (Sigma-Aldrich) e anticorpo de cabra anti-slga humana (1/500 - Sigma-Aldrich).

3.12 Desafio de colonização

A colonização da nasofaringe por pneumococo nos animais imunizados foi avaliada 5 dias após o desafio nasal com 5×10^6 UFC de *S. pneumoniae* em volume final de 10 µL. Os animais foram sacrificados com injeção de uma dose letal de uretano (15 mg de uretano por 10 g de massa corporal) (Sigma - Aldrich) e foram realizados lavados nasais. Após o isolamento e incisão na traquéia, uma cânula de silicone foi introduzida na mesma e 200 µL de PBS 1x estéril foram utilizados para a lavagem do trato respiratório superior. Esse procedimento foi realizado duas vezes. O volume foi coletado pelo orifício nasal. Quatro diluições dos lavados nasais foram plaqueadas em placas de ágar sangue contendo 4 µg/mL de gentamicina. Após crescimento por 16 horas a 37 °C, o número de UFCs de *S. pneumoniae* foi determinado. A análise estatística da diferença na colonização da nasofaringe dos camundongos foi avaliada pelo teste ANOVA, utilizando-se o programa GraphPad Prism5.

4 RESULTADOS

4.1 Classificação do clado de PspA e do grupo PspC

Para determinar a classificação do clado de PspA, a região definidora de clado (CDR) foi sequenciada. O *locus* completo de *pspC* dos 13 isolados foi clonado e o gene também foi sequenciado. Foram encontrados 7 isolados com *pspA* de família 1 (4 isolados de PspA clado 1 (PspA1) e 3 isolados de PspA clado 2 (PspA2)) e 6 isolados com *pspA* de família 2 (3 isolados de PspA clado 3 (PspA3) e 3 isolados de PspA clado 4 (PspA4)). Esses dados estão de acordo com a literatura, mostrando que aproximadamente metade dos isolados pertence à família 1 e a outra metade pertence à família 2. Em relação a *pspC*, foram encontrados 6 isolados do grupo 3 (PspC3), 3 isolados do grupo 6 (PspC6), 1 isolado do grupo 5 (PspC5), 1 isolado do grupo 8 (PspC8) e 1 isolado do grupo 9 (PspC9), além de uma duplicação contendo PspC do grupo 4 e 10 (PspC4 e PspC10). A maioria dos alelos sequenciados codifica para proteínas com o motivo de ligação à colina para o ancoramento de PspC na superfície da bactéria (HU1-PspC6, HU4-PspC3, HU5-PspC3, HU6A-PspC3, HU6B-PspC4, HU7F-PspC6, HU9V-PspC3, HU14-PspC3, HU18C-PspC6, HU19A-PspC5 e HU23F-PspC3), e 3 alelos (HU3-PspC8, HU6B-PspC10 e HU19F-PspC9) codificam proteínas com a sequência de ancoramento através do motivo LPXTG. As sequências foram depositadas no *GenBank* com os números de acesso indicados na Tabela 6. O isolado St491/00 foi incluído nas análises, já que *pspC3* foi amplificado e clonado desta linhagem.

Tabela 6 - Classificação do clado de PspA e do grupo PspC.

Isolados	PspA	PspC	Ancoramento de PspC	Acesso GenBank (<i>pspC</i>)
HU1	clado 1	PspC6	Ligação à colina	GU138629.1
HU3	clado 2	PspC8	Motivo LPXTG	GU138630.1
HU4	clado 4	PspC3	Ligação à colina	GU138631.1
HU5	clado 1	PspC3	Ligação à colina	GU138632.1
HU6A	clado 2	PspC3	Ligação à colina	GU138633.1
HU6B	clado 3	PspC4/ PspC10	Ligação à colina Motivo LPXTG	GU138634.1 GU138635.1
HU7F	clado 3	PspC6	Ligação à colina	GU138636.1
HU9V	clado 3	PspC3	Ligação à colina	GU138637.1
HU14	clado 1	PspC3	Ligação à colina	GU138638.1
HU18C	clado 4	PspC6	Ligação à colina	GU138639.1
HU19A	clado 1	PspC5	Ligação à colina	GU138640.1
HU19F	clado 4	PspC9	Motivo LPXTG	GU138641.1
HU23F	clado 2	PspC3	Ligação à colina	GU138642.1
St491/00	clado 1	PspC3	Ligação à colina	EF424119.1

4.2 Mapeamento dos domínios de ligação a FH e *slgA*.

Realizamos o alinhamento de todas as sequências de PspC dos isolados clínicos e da bactéria D39 (Apêndice 1), utilizando o programa COBALT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>). De acordo com a literatura, existe uma sequência consenso de 12 aminoácidos (ALNIKLSAIKTK) que é responsável pela ligação do FH humano, sendo 4 aminoácidos considerados altamente conservados (aminoácidos em destaque) (Lu et al., 2006). Podemos observar na Figura 8 que dos 4 aminoácidos altamente conservados, pelo menos 2 aminoácidos estavam presentes em todos os isolados clínicos (leucina na posição 6 e isoleucina na posição 9). Das 14 sequências de *pspC* analisadas (lembrando que HU6B contém uma duplicação PspC4/PspC10), 9 isolados contêm na sequência consenso os 4 aminoácidos altamente conservados (HU1-PspC6, HU3-PspC8, HU4-PspC3, HU5-PspC3, HU6B-PspC10, HU7F-PspC6, HU9V-PspC3, HU14-PspC3 e HU19F-PspC9), 4 isolados contêm na sequência consenso 3 aminoácidos altamente conservados (HU6A-PspC3, HU6B-PspC4, HU19A-PspC5 e HU23F-PspC3) e 1 isolado contêm 2 aminoácidos altamente conservados (HU18C-PspC6).

D39-	PspC3	-HTQNV	ALNIKLSAIKTK	YLRELNVL---
HU1-	PspC6	-HTQNV	GLITKLSEIKKK	LYELEVNVLL
HU3-	PspC8	-HKDTV	DLVNKLQEIKNE	YLNKIVEST--
HU4-	PspC3	-HTQNV	GLLTKLGVIKTE	YLHGLSVS---
HU5-	PspC3	KHTQNV	GLLTKLGAIKTE	YLHGLSVS---
HU6A-	PspC3	-HTQNV	AFNMKLSAIKTE	YLYGL-----
HU6B-	PspC4	-HTQNV	DFNKKLSRIKTK	YLYGLKEKS--
HU6B-	PspC10	-HINTV	ELIKKLGDIKRT	YLYKFDEST--
HU7F-	PspC6	-HIKTV	NLINKLQDIKRT	YLYELNVL---
HU9V-	PspC3	-HTQNV	GLLTKLGVIKTE	YLHGLSVS---
HU14-	PspC3	-HTQNV	GLLTKLGVIKTE	YLHGLSVS---
HU18C-	PspC6	-HTQNV	NFNKKLSIIQTK	YFYELNVL---
HU19A-	PspC5	-HTQNV	NLNKLSAIQTK	YLYELRVL---
HU19F-	PspC9	-HKNTV	ALVNQLGNIKNR	YLNEIVHST--
HU23F-	PspC3	-HTQNV	AFNMKLSAIKTE	YLYGL-----

Figura 8 - Análise da região consenso de ligação de FH após o alinhamento das sequências de PspC. As sequência de PspC foram alinhadas utilizando o programa de alinhamento de múltiplas sequências COBALT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>). Os aminoácidos idênticos à sequência consenso (ALNIKLSAIKTK – destacado em amarelo) de ligação do FH da bactéria D39 e as posições dos aminoácidos conservados estão destacados em azul claro (posição 2 (leucina), 6 (leucina), 9 (isoleucina) e 10 (lisina)). A figura na íntegra encontra-se no Apêndice 1.

Hammerschmidt e colaboradores descreveram a sequência consenso de 6 aminoácidos (Y(H/R)RNYPT) para a ligação de sIgA (Hammerschmidt et al., 2000). Na análise do alinhamento, podemos observar que todas as sequências possuem esse motivo, com exceção dos isolados, HU3-PspC8, HU19F-PspC9 e HU6B-PspC10, o que está de acordo com resultados publicados na literatura, mostrando que as variantes de PspC dos grupos 8 a 11 não possuem este hexapeptídeo (Iannelli et al., 2002). A maioria dos isolados apresentou duas cópias desse motivo nas regiões de repetição R1 e R2 (HU4-PspC3, HU6A-PspC3, HU7F-PspC6, HU9V-PspC3, HU14-PspC3, HU18C-PspC6, HU19A-PspC5 e HU23F-PspC3). O isolado HU6B-PspC4 possui apenas a primeira cópia, enquanto que os isolados HU1-PspC6 e HU5-PspC3 apresentam apenas a segunda cópia, como podemos observar na Figura 9.

R1				R2			
D39-	PspC3	KKAE DQKEEDRRNYPT NTYK	135	D39-	PspC3	284	KEED RRNYPT NTYKTL
HU1-	PspC6	-----	100	HU1-	PspC6	124	KEED FRNYPT NTYKTI
HU3-	PspC8	-----	115	HU3-	PspC8	131	-----
HU4-	PspC3	KKAE DQKEEDLRNYPT NTYK	136	HU4-	PspC3	284	KEED RRNYPT NTYKTL
HU5-	PspC3	-----	97	HU5-	PspC3	121	KEED RRNYPT NTYKTL
HU6A-	PspC3	KKAKAQKEGD RRNYPT ITYK	132	HU6A-	PspC3	280	KEED RRNYPT ITYKTL
HU6B-	PspC4	KKAKAQKEED RRNYPT NTYK	128	HU6B-	PspC4	281	MVTRLTKLDPSVFWFA
HU6B-	PspC10	-----	342	HU6B-	PspC10	359	-----
HU7F-	PspC6	KKAKAQKEED HRNYPT ITYK	137	HU7F-	PspC6	280	KEED RRNYPT NTYKTL
HU9V-	PspC3	KKAE DQKEEDLRNYPT NTYK	136	HU9V-	PspC3	284	KEED RRNYPT NTYKTL
HU14-	PspC3	KKAE DQKEEDLRNYPT NTYK	136	HU14-	PspC3	284	KEED RRNYPT NTYKTL
HU18C-	PspC6	KKAKAQKEED RRNYPT NTYK	134	HU18C-	PspC6	282	KEED RRNYPT NTYKTL
HU19A-	PspC5	QKAKAQKEED FRNYPT NTYK	141	HU19A-	PspC5	379	KEED RRNYPT NTYKTL
HU19F-	PspC9	-----	116	HU19F-	PspC9	133	-----
HU23F-	PspC3	KKAKAQKEED RRNYPT ITYK	132	HU23F-	PspC3	280	KEED RRNYPT ITYKTL

Figura 9 - Análise da região consenso de ligação de slgA após o alinhamento das sequências de PspC. As sequência de PspC foram alinhadas utilizando o programa de alinhamento de múltiplas sequências COBALT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>). Os aminoácidos idênticos à sequência consenso, o motivo hexapeptídico da ligação de slgA Y(R ou H ou F ou L)RNYPT da bactéria D39 é mostrado em vermelho e os aminoácidos críticos YPT para a ligação de slgA estão destacados em amarelo) R1 - região de repetição 1 e R2 - região de repetição 2. A figura na íntegra encontra-se no Apêndice 1.

4.3 Clonagem de pspC

Para a obtenção dos fragmentos gênicos codificando a região N-terminal de *pspC*, foi realizada amplificação por PCR dos plasmídeos contendo os genes *pspC5* e *pspC8*. Os produtos de PCR foram purificados através da eletroforese em gel de agarose 1%, as bandas purificadas foram inseridas no vetor pGEM-T-Easy, e as sequências confirmadas por sequenciamento. Os fragmentos foram clonados no vetor pAE-6xHis para expressão em *E. coli* BL21 (Si). A presença do inserto no vetor foi confirmada através da análise de restrição em eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 10).

Figura 10 - Análise de restrição por eletroforese em gel de agarose 1% dos vetores pAE-*pspC* construídos. 1. Padrão de massa molecular (1Kb plus); 2. pAE-6xHis; 3. pAE-6xHis digerido com BamHI e KpnI; 4. pAE-*pspC5*; 5. pAE-*pspC5* digerido com BamHI e KpnI; 6. pAE-*pspC8*; 7. pAE-*pspC8* digerido com BamHI e KpnI.

4.4 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Células de *E. coli* BL21 (Si) transformadas com os vetores pAE-6xHis contendo os fragmentos de *pspC* foram cultivadas e induzidas com 300 mM de NaCl para a expressão dos fragmentos de PspC. Após a análise da expressão inicial dos fragmentos de PspC, os cultivos foram preparados em maior volume e o sobrenadante do lisado submetido à cromatografia em resina de quelante de Ni^{2+} . Frações de todas as etapas da purificação foram coletadas. Após a purificação, todas as frações de lavagens e eluições foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 10% para verificar em qual das frações se encontrava a proteína purificada. Em seguida, essas frações que continham PspC foram dialisadas.

A Figura 11 mostra as proteínas expressas pelos os vetores pAE-*pspC3*, pAE-*pspC5*, pAE-*pspC8* e purificadas. As bandas correspondentes às proteínas PspC3, PspC5 e PspC8 observadas em SDS-PAGE apresentam massa molecular acima do predito, 46,3 kDa, 41,3 kDa e 20,2 kDa, respectivamente. Esse tipo de migração anômala está descrita na literatura tanto para PspA como para PspC (Brooks-Walter et al., 1999; Yother, Briles, 1992) e foi observada também para todos os fragmentos de PspA já expressos em nosso laboratório.

Figura 11 - Análise por SDS-PAGE 12% dos fragmentos de PspC purificados. 1. Padrão de massa molecular; 2. PspC3 recombinante; 3. PspC5 recombinante; 4. PspC8 recombinante.

4.5 Produção de anticorpos policlonais em camundongos

A produção dos anticorpos policlonais anti-PspC3, anti-PspC5, anti-PspC8 foi realizada através de administração subcutânea de 5 µg da proteína recombinante purificada de *E. coli* com hidróxido de alumínio como adjuvante, em grupos de 6 camundongos da linhagem BALB/c. Duas semanas após a terceira imunização, os soros dos camundongos foram coletados e uma alíquota foi preparada com soro de cada animal imunizado do mesmo grupo e esse “pool” dos soros foi utilizado para determinar a concentração de IgG total anti-PspC por ELISA. As concentrações de anticorpos IgG obtidas foram de 1,4 µg/mL de anti-PspC3, 13,8 µg/mL de anti-PspC5 e 33,8 µg/mL de anti-PspC8. Essa concentração foi determinada e calculada a partir da curva padrão de IgG de camundongo.

4.6 Reatividade dos soros anti-PspC com os isolados de pneumococo

Extratos proteicos dos 13 isolados de pneumococo foram separados por SDS-PAGE 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose. PspC foi detectado através das incubações das membranas com os diferentes soros anti-PspC. Como anticorpos anti-PspC poderiam reconhecer tanto PspA quanto PspC, fizemos a análise dos soros anti-PspA4 e anti-PspC em paralelo para distinção do tamanho (massa molecular) das duas proteínas. O soro anti-PspA4 foi utilizado como controle uma vez que dados gerados pelo nosso grupo demonstraram que o anticorpo anti-PspA4 apresenta uma ampla reatividade cruzada, reconhecendo quase todos os

isolados testados (Darrieux et al., 2008; Moreno et al., 2010). O soro anti-PspC3 (Figura 12A) foi capaz de reconhecer a maioria dos isolados de pneumococo. Os isolados HU9V-PspA3/PspC3 e HU14-PspA1/PspC3 apresentaram uma baixa reatividade, apresentando uma banda muito fraca e apenas o isolado HU19A-PspA1/PspC5 não foi reconhecido por este soro. Em três isolados, observou-se outra banda, provavelmente de PspA (isolados HU1-PspA1/PspC6, HU3-PspA2/PspC8 e HU6A-PspA2/PspC3). O soro anti-PspA4 (Figura 12D) mostrou-se capaz de reconhecer a maioria dos isolados. Estes resultados estão de acordo com dados anteriores obtidos em nosso laboratório com isolados da Universidade Federal de Goiás, que mostraram ampla reatividade cruzada do soro anti-PspA4 (Darrieux et al., 2008), mas podemos observar uma baixa reatividade com os isolados HU6B-PspA3/PspC4/PspC10 e HU9V-PspA3/PspC3. Nos isolados HU1-PspA1/PspC6, HU4-PspA4/PspC3, HU23F-PspA2/PspC3 e 491/00-PspA1/PspC3 foram reconhecidas bandas que são provavelmente de PspC. Tanto o nível de expressão de PspC nos diferentes isolados, como o grau de similaridade entre PspA e PspC podem interferir nesta análise.

Os soros anti-PspC5 e anti-PspC8 também foram testados quanto à reatividade com os extratos proteicos dos 13 diferentes isolados de pneumococo. Podemos observar na Figura 12B, que o soro anti-PspC5 foi capaz de reconhecer proteínas em diferentes isolados. No entanto, ao compararmos as bandas obtidas com o resultado com soro anti-PspA4 (Figura 12D), as bandas reconhecidas pelo soro anti-PspC5 parecem corresponder a PspA e não a PspC. PspC5 pertence ao grupo de PspC que possui uma região com alta homologia com PspA. Essa região de homologia encontra-se em PspA dentro da CDR de clado 2 (família 1). É interessante notar que os isolados reconhecidos por anti-PspC5 possuem PspA de família 1 (HU3-PspA2/PspC8, HU6A-PspA2/PspC3, HU14-PspA1/PspC3 e HU19A-PspA1/PspC5, e HU23F-PspA2/PspC3), o que estaria de acordo com a hipótese de anti-PspC5 estar reconhecendo PspA e não PspC. O soro anti-PspC8 também foi testado nos diferentes isolados de pneumococos e foi capaz de reconhecer apenas o isolado HU3-PspA2/PspC8, único isolado que expressa PspC8 (Figura 12C).

A – Anti-PspC3

C – Anti-PspC8

B – Anti-PspC5

D – Anti-PspA4

Figura 12 – Análise por *immunoblotting* da reatividade dos soros anti-PspC3, anti-PspC5, anti-PspC8 e anti-PspA4 com os isolados de pneumococo. Soros dos camundongos imunizados com PspC3 (A), PspC5 (B), PspC8 (C) ou PspA4 (D) foram testados quanto à reatividade com os 13 extratos de pneumococo expressando diferentes PspAs e PspCs. A identificação dos isolados está indicada em cima de cada “blot”. A migração do padrão de massa molecular esta indicada à direita. * indica PspC, # indica PspA e ? indica banda que pode ser PspA ou PspC.

Os sobrenadantes de cultura dos isolados também foram avaliados quanto à reatividade com os soros anti-PspA4, anti-PspC3 e anti-PspC5 (Figura 13). Na Figura 13A, podemos observar que o soro anti-PspA4 apresentou reatividade com todos os isolados testados, com exceção de HU18C-PspA4/PspC6. Foi observada reatividade cruzada com PspC nos isolados HU1-PspA1/PspC6, HU4-PspA4/PspC3 e HU18C-PspA4/PspC6 e apenas no isolado HU9V-PspA3/PspC3 não conseguimos determinar se o reconhecimento foi de PspA ou PspC. O soro anti-PspC3 (Figura 13B) apresentou uma grande reatividade com os isolados, não reconhecendo apenas o isolado HU6B-PspA3/PspC4/PspC10. Podemos observar que houve reatividade cruzada com PspA em 8 isolados (HU1-PspA1/PspC6, HU3-PspA2/PspC8, HU4-PspA4/PspC3, HU6A-PspA2/PspC3, HU14-PspA1/PspC3, HU19A-PspA1/PspC5, HU19F-PspA4/PspC9 e HU23F-PspA2/PspC3) e em 3 isolados (HU5-PspA1/PspC3, HU9V-PspA3/PspC3 e uma das bandas do isolado HU14-PspA1/PspC3) não conseguimos determinar se o reconhecimento foi de PspA ou PspC. As bandas reconhecidas pelo soro anti-PspC5 em 5 isolados (HU3-PspA2/PspC8, HU5-PspA1/PspC3, HU6B-PspA3/PspC4/PspC10, HU9V-PspA3/PspC3 e HU19A-PspA1/PspC5) (Figura 13C) parecem corresponder a PspA e não a PspC, assim como foi observado nas amostras de extrato total (Figura 12B). Esse experimento não foi realizado com o soro anti-PspC8, pois seu reconhecimento havia sido restrito ao isolado de onde ele foi clonado (HU3-PspA2/PspC8) no *immunoblotting* com extrato proteico (Figura 12C).

De uma maneira geral, pudemos observar que tanto PspA quanto PspC são liberados no sobrenadante de cultura e que PspA parece ser liberado em maior proporção. É possível que a detecção de PspA e PspC no sobrenadante do cultivo celular seja decorrente da lise de parte das células.

Figura 13 - Análise por *immunoblotting* da reatividade dos soros anti-PspA4, anti-PspC3 e anti-PspC5 com sobrenadante de cultura dos 13 isolados de pneumococo. Soros de camundongos imunizados com PspA4 (A), PspC3 (B) e PspC5 (C) foram testados quanto à reatividade com sobrenadante de cultura dos 13 isolados de pneumococo expressando diferentes PspAs e PspCs. A identificação dos isolados está indicada em cima de cada “blot”. * indica PspC, # indica PspA e ? indica banda que pode ser PspA ou PspC. A migração do padrão de massa molecular esta indicada à direita.

4.7 Ligação de FH e slgA aos extratos proteicos dos isolados de pneumococo

A capacidade de interação dos extratos proteicos dos isolados de pneumococo com FH e slgA humanos foi avaliada em experimentos de *immunoblotting* com sobreposição (Figura 14). Na Figura 14A, podemos observar a interação do FH com todos os extratos proteicos, com exceção do isolado HU19F-PspC9. Observamos que há uma diferença na intensidade de ligação aos diferentes extratos: uma forte ligação do FH nos isolados HU1-PspC6, HU6A-PspC3, HU7F-PspC6, HU18C-PspC6, HU23F-PspC3 e 491/00-PspC3 e uma fraca ligação no restante dos isolados (HU3-PspC8, HU4-PspC3, HU5-PspC3, HU6B-PspC4/PspC10, HU9V-PspC3, HU14-PspC3 e HU19A-PspC5). Ao avaliar a interação do slgA (Figura 14B) observamos, de uma forma geral, um sinal mais baixo dessa interação quando comparada a interação de FH, com uma ligação mais forte com os isolados HU9V-PspC3, HU14-PspC3, HU18C-PspC6, HU23F-PspC3 e 491/00-PspC3 e uma ligação mais fraca com os isolados HU1-PspC6, HU4-PspC3, HU6A-PspC3 e HU7F-PspC6. Com os demais isolados, não houve ligação (HU3-PspC8, HU5-PspC3, HU6B-PspC4/PspC10, HU19A-PspC5 e HU19F-PspC9).

Figura 14 - Análise por *immunoblotting* com sobreposição da interação de FH e sIgA com os diferentes isolados de pneumococo. A capacidade dos extratos proteicos dos isolados de pneumococo indicados acima de cada "blot" de ligar FH (A) ou sIgA (B) foi avaliada utilizando-se anticorpo anti-FH e anticorpo anti-sIgA, respectivamente. A migração do padrão de massa molecular está indicada à direita.

O sobrenadante de cultura dos isolados de pneumococo também foi avaliado quanto à interação com FH e sIgA (Figura 15). Na Figura 15A, podemos observar que houve uma forte ligação de FH em 7 isolados (HU1-PspC6, HU6A-PspC3, HU7F-PspC6, HU9V-PspC3, HU18C-PspC6, HU23F-PspC3 e 491/00-PspC3), uma baixa ligação em 6 isolados (HU4-PspC3, HU5-PspC3, HU6B-PspC4/PspC10, HU14-PspC3, HU19A-PspC5 e HU19F-PspC9) e não foi observada ligação no isolado HU3-PspC8. Quanto à ligação com sIgA (Figura 15B), podemos observar uma baixa interação com os sobrenadantes de cultura com detecção de ligação apenas em 4 isolados (HU1-PspC6, HU4-PspC3, HU6A-PspC3 e 491/00-PspC3).

Figura 15 - Análise por *immunoblotting* com sobreposição da interação de FH e sIgA com sobrenadante de cultura de pneumococo. A capacidade dos sobrenadantes de cultura dos isolados de pneumococo indicados acima de cada “blot” de ligar FH (A) ou sIgA (B) foi avaliada utilizando-se anticorpo anti-FH e anticorpo anti-sIgA, respectivamente. A migração do padrão de massa molecular está indicada à direita.

4.8 Purificação de IgG anti-PspC

Seria ideal que os anticorpos gerados contra PspC fossem capazes não somente de ligar-se à proteína, mas também que as funções de PspC de ligação a FH e sIgA também fossem bloqueadas. Foram realizados então ensaios para avaliar a capacidade dos soros anti-PspC em bloquear a ligação de FH e sIgA. Ensaios preliminares mostraram que há interferência dos soros dos camundongos imunizados, já que as amostras possuem altos níveis de FH, além de possivelmente apresentar IgA. Como protocolo alternativo, decidimos purificar os anticorpos anti-PspC em colunas de proteína G-sepharose. Podemos observar na Figura 16 o perfil de purificação dos anticorpos IgG anti-Intimina (controle negativo) (Figura 16A), IgG anti-PspC3 (Figura 16B) e IgG anti-PspC5 (Figura 16C).

Figura 16 - Análise por SDS-PAGE 12% da purificação de anticorpos IgG anti-Intimina, anti-PspC3 e anti-PspC5. PM: indica o padrão de massa molecular, 1: indica o “pool” do soro antes de passar na coluna, FT: indica o “Flow Through”, Lav: indica as lavagens com 20 mM de fosfato de sódio e Elu: indica as eluições com 0,1 M de glicina-HCl, pH 2,7.

A análise por SDS-PAGE 10% em condições redutoras mostraram a presença de duas bandas. A primeira banda está entre 66 e 45 kDa, que corresponde à cadeia pesada de Ig, e a segunda banda está entre 30 e 21 kDa, que corresponde à cadeia leve de Ig. As frações que continham o IgG purificado foram dialisadas separadamente e a concentração de IgG foi determinada por ELISA utilizando uma curva padrão de IgG de camundongo. As alíquotas foram estocadas a -20 °C.

4.9 Ensaio de bloqueio da ligação de FH e sIgA por *immunoblotting*

Foram realizados ensaios para avaliar a capacidade dos IgG anti-PspC em bloquear a ligação de FH e sIgA. Extratos proteicos dos 13 isolados clínicos de pneumococo foram separados por SDS-PAGE 10% e transferidos para membranas de nitrocelulose. O bloqueio foi avaliado através da pré-incubação das membranas

com IgG anti-PspC3 ou IgG anti-PspC5 antes da detecção da ligação de FH ou slgA aos extratos. Como controle negativo foi utilizado anticorpo IgG anti-Intimina.

Na Figura 17A, podemos observar que houve uma pequena redução na interação do FH nos isolados HU1-PspC6, HU6A-PspC3, HU7F-PspC6, HU9V-PspC3, HU18C-PspC6, HU19A-PspC5, HU19F-PspC9, HU23F-PspC3 e 491/00-PspC3 na membrana previamente incubada com anticorpo IgG anti-PspC3, quando comparada com a membrana incubada previamente com o anticorpo IgG anti-Intimina (Figura 17B). Já a membrana incubada previamente com o anticorpo IgG anti-PspC5 (Figura 17C) apresentou uma redução maior na interação de PspC na maioria dos isolados com FH, com uma redução bem acentuada nos isolados HU9V-PspC3, HU18C-PspC6 e HU19F-PspC9 e bloqueio quase integral no isolado HU19A-PspC5.

Já nos ensaios do bloqueio da ligação de slgA, a membrana incubada previamente com o anticorpo IgG anti-PspC3 (Figura 17D) apresentou uma pequena redução na interação com slgA quando comparada com a membrana incubada previamente com o anticorpo IgG anti-Intimina (Figura 17E). A membrana incubada previamente com o anticorpo IgG anti-PspC5 (Figura 17F) apresentou pouca ou nenhuma redução na ligação de slgA. Não foi observado bloqueio integral da ligação de slgA nos isolados testados com o anticorpo IgG anti-PspC. Este experimento foi otimizado e padronizado com a concentração de anticorpos IgG anti-PspC, tempo de incubação dos mesmos e exposição durante a revelação.

Figura 17 - Análise por *immunoblotting* com sobreposição do bloqueio da ligação de FH e slgA por anticorpos IgG anti-PspC em isolados clínicos de pneumococos. A inibição da ligação de FH com os extratos proteicos de pneumococos foi avaliada após a incubação com o anticorpo IgG anti-PspC3 (A), anticorpo IgG anti-Intimina (B) e anticorpo IgG anti-PspC5 (C). As membranas foram incubadas com FH humano e a detecção foi realizada com anticorpos anti-FH. A inibição de ligação de slgA com os extratos proteicos de pneumococos foi avaliada após a incubação com o anticorpo IgG anti-PspC3 (D), anticorpo IgG anti-Intimina (E) e anticorpo IgG anti-PspC5 (F). As membranas foram incubadas com slgA humano e a detecção foi realizada com anticorpos anti-slga. Anticorpo IgG anti-Intimina foi utilizada como controle negativo. A identificação do sorotipo e do grupo de PspC está indicada acima de cada “blot”. A migração do padrão de massa molecular está indicada à direita.

Para a quantificação da redução da ligação de FH e sIgA nos “blots”, foi determinada a intensidade de cada banda por densitometria através do programa ImageJ. Podemos observar na Figura 18 que a análise realizada corrobora as conclusões apresentadas nos ensaios de *immunoblotting*, com menor intensidade das bandas na ligação de FH nos “blots” incubados previamente com o anticorpo IgG anti-PspC5 e menor intensidade das bandas na ligação de sIgA com o anticorpo IgG anti-PspC3.

Figura 18 - Análise densitométrica das bandas dos “blots” da Figura 17. A densidade das bandas dos “blots” incubados com o anticorpo IgG anti-PspC3 ou anticorpo IgG anti-PspC5 da Figura 17 dos isolados indicados foi determinada utilizando o programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). As intensidades das bandas estão indicadas como porcentagem da mesma banda nos “blots” incubados com o controle IgG anti-Intimina antes da detecção de FH (A) ou sIgA (B).

4.10 Avaliação da ligação de anticorpos anti-PspC à superfície da bactéria intacta

Os anticorpos IgG purificados foram utilizados em ensaio funcional de ligação à superfície de *S. pneumoniae*. Isolados expressando diferentes grupos de PspC foram cultivados e incubados com 1 µg de IgG anti-PspC3 e anti-PspC5 purificados (como controle negativo, foi utilizado IgG anti-Intimina). A ligação dos anticorpos foi avaliada após incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a FITC. Foram escolhidos dois representantes do grupo PspC3 (HU6A e HU9V) e um representante dos grupos PspC6 (HU18C), PspC5 (HU19A) e PspC8 (HU3) (Figura 19).

No isolado HU3-PspA2/PspC8 (Figura 19A), IgG anti-PspC3 não foi capaz de se ligar à superfície da bactéria, enquanto que IgG anti-PspC5 foi capaz de ligar-se fracamente. É possível que essa ligação seja através de reatividade cruzada com PspA. No isolado HU6A-PspA2/PspC3 (Figura 19B), IgG anti-PspC5 ligou-se fracamente à superfície da bactéria, enquanto que IgG anti-PspC3 apresentou uma ligação pronunciada na superfície da bactéria. No isolado HU9V-PspA3/PspC3 (Figura 19C), IgG anti-PspC5 não foi capaz de se ligar à superfície da bactéria, enquanto que IgG anti-PspC3 foi capaz ligar-se fracamente à superfície da bactéria. No isolado HU18C-PspA4/PspC6 (Figura 19D), IgG anti-PspC3 apresentou maior nível de ligação à superfície da bactéria do que IgG anti-PspC5, indicando que IgG anti-PspC3 é capaz de reconhecer PspC6. No isolado HU19A (PspA1/PspC5) (Figura 19E), IgG anti-PspC3 não foi capaz de ligar-se à bactéria, enquanto que IgG anti-PspC5 foi capaz de se ligar à superfície da bactéria. IgG anti-Intimina não mostrou interferência nos ensaios, não sendo capaz de se ligar a nenhum dos isolados testados.

Figura 19 - Ligação de anticorpos IgG anti-PspC à superfície do pneumococo. IgG anti-PspC3, anti-PspC5 e anti-Intimina foram testados por citometria de fluxo quanto à capacidade de ligar-se na superfície intacta do pneumococo. Os resultados são apresentados como histograma de intensidade de fluorescência e a mediana total da fluorescência das bactérias está indicada em cada amostra.

4.11 Ligação de FH e slgA à superfície da bactéria intacta

Foi avaliada a capacidade do FH de ligar-se à superfície intacta de *S. pneumoniae*. Os isolados foram cultivados e incubados com FH, seguindo-se a incubação com anticorpo de cabra anti-FH e posteriormente a incubação com anticorpo anti-IgG de cabra conjugado a FITC. Como controle, foi utilizada a bactéria apenas incubada com anticorpo conjugado a FITC, representado em cinza no histograma. Outro controle foi realizado com a bactéria incubada apenas com anti-FH e com anticorpo conjugado a FITC, que está representado pela linha pontilhada. Podemos observar na Figura 20, que o FH foi capaz de se ligar em todas as bactérias, com diferentes intensidades, com exceção da bactéria HU19A-PspC5.

Também foi avaliada a capacidade de slgA de ligar-se à superfície intacta de *S. pneumoniae*. Os isolados foram cultivados e incubados com slgA, seguindo-se incubação com anticorpo de cabra anti-slga e posteriormente incubação com anticorpo anti-IgG de cabra conjugado a FITC. Novamente, como controle foi utilizada a bactéria apenas incubada com anticorpo conjugado a FITC, representado em cinza no histograma. Outro controle foi feito com a bactéria incubada apenas com anti-slga e com anticorpo conjugado a FITC, que está representada pela linha pontilhada. Podemos observar na Figura 21 que, de maneira geral, o slgA também foi capaz de ligar-se em todas as bactérias testadas, com diferentes intensidades. No entanto, foi observada uma forte interferência do anticorpo anti-slga (controle representado pela linha pontilhada) nos isolados HU3-PspC8 e HU18C-PspC6. Ensaio preliminares com diferentes diluições desse anticorpo (1/100 e 1/1000) também mostraram essa interferência (dados não mostrados). Como HU3-PspC8 não possui a sequência consenso de ligação a slgA (Figura 9), esse resultado foi interpretado como negativo.

Figura 20 - Ligação de FH à superfície do pneumococo. FH foi testado quanto à capacidade de ligar-se na superfície intacta do pneumococo. Como controles foram utilizadas as bactérias incubadas apenas com anticorpo conjugado a FITC, representada pela área cinza, e a bactéria incubada com anti-FH e anticorpo conjugado a FITC, representadas pela linha pontilhada. Os resultados são apresentados na forma de histograma de intensidade de fluorescência e a mediana total da fluorescência das bactérias está indicada em cada amostra.

Figura 21 - Ligação de sIgA à superfície do pneumococo. O sIgA foi testado quanto à capacidade de ligar-se na superfície intacta do pneumococo. Como controle, foram utilizadas as bactérias incubada apenas com anticorpo conjugado a FITC, representadas pela área cinza, e a bactéria incubada com anti-sIgA e anticorpo conjugado a FITC, representada pela linha pontilhada. Os resultados são apresentados na forma histograma de intensidade de fluorescência e a mediana total da fluorescência das bactérias está indicada em cada amostra.

Resolvemos realizar esses experimentos de ligação com IgG anti-PspC, FH e slgA por citometria de fluxo, utilizando também as linhagens de laboratório TIGR4-PspA3/PspC3 e D39-PspA2/PspC3. Ao realizarmos o ensaio de ligação de IgG anti-PspC, FH e slgA à superfície da bactéria TIGR4-PspA3/PspC3, podemos observar na Figura 22A que IgG anti-PspC3 foi capaz de ligar-se eficientemente à superfície da bactéria, ao contrário de IgG anti-PspC5. Na Figura 22B, podemos observar que o FH não foi capaz de se ligar na superfície da bactéria, mas podemos observar uma ligação eficiente de slgA (Figura 22C). A falta de interação de FH com a bactéria TIGR4-PspA3/PspC3 analisada por citometria de fluxo já foi descrita na literatura (Hammerschmidt et al., 2007).

Na bactéria TIGR4 Δ pspA, IgG anti-PspC3 foi capaz de ligar-se eficientemente à superfície da bactéria, enquanto que IgG anti-PspC5 mais uma vez não apresentou ligação (Figura 22D). Não foi observada nenhuma ligação do FH na superfície da bactéria (Figura 22E), porém uma ligação eficiente de slgA foi observada (Figura 22F). Já na bactéria TIGR4 Δ pspC, como esperado, não houve ligação de IgG anti-PspC (Figura 22G), FH (Figura 22H) ou slgA (Figura 22I), confirmando que a ligação do IgG anti-PspC3 e de slgA é exclusivamente via PspC e não através de PspA.

Figura 22 - Análise da ligação de IgG anti-PspC, FH e sIgA à superfície das bactérias TIGR4, TIGR4 Δ pspA e TIGR4 Δ pspC. A capacidade de IgG anti-PspC3, IgG anti-PspC5 e IgG anti-Intimina (A, D e G), FH (B, E e H) e sIgA (C, F e I) de ligar-se à superfície intacta do pneumococo foi testada por citometria de fluxo. Como controle foi utilizada a bactéria incubada apenas com anticorpo conjugado a FITC, representado pelas áreas cinza em cada histograma. Também foi utilizado como controle as bactérias sem a incubação de FH ou sIgA (linha pontilhada: B, C, E, F, H e I). Os resultados são apresentados na forma histograma de intensidade de fluorescência e a mediana da fluorescência total das bactérias está indicada em cada amostra.

Na bactéria D39-PspA2/PspC3, IgG anti-PspC3 foi o único capaz de ligar-se eficientemente na superfície da bactéria (Figura 23A). FH (Figura 23B) e sIgA (Figura 23C) também foram capazes de se ligar à superfície da bactéria intacta, mas podemos observar que houve uma interferência do anticorpo anti-FH e anti-sIgA em ambos os ensaios (Figura 23B e 23C). Quando utilizamos a bactéria D39 Δ pspA,

podemos observar uma ligação eficiente de IgG anti-PspC3 e uma baixa ligação de IgG anti-PspC5 (Figura 23D). Ao avaliarmos a capacidade da ligação de FH e sIgA na superfície da bactéria, podemos observar que ambos foram capazes de se ligar eficientemente à superfície da bactéria (Figuras 23E e 23F, respectivamente). Também podemos observar que não houve a interferência dos anticorpos anti-FH ou anti-sIgA, como ocorreu na bactéria selvagem (Figuras 23B e 23C).

Figura 23 - Análise da ligação de IgG anti-PspC, FH e sIgA à superfície das bactérias D39 e D39 Δ pspA. A capacidade de IgG anti-PspC3, IgG anti-PspC5 e IgG anti-Intimina (A e D), FH (B e E) e sIgA (C e F) de ligar-se à superfície intacta do pneumococo foi testada por citometria de fluxo. Como controle foi utilizada a bactéria incubada apenas com anticorpo conjugado a FITC, representado pelas áreas cinza em cada histograma. Também foi utilizado como controle as bactérias sem a incubação de FH ou sIgA (linha pontilhada: B, C, E e F). Os resultados são apresentados na forma de histograma de intensidade de fluorescência e a mediana da fluorescência total das bactérias está indicada em cada amostra.

4.12 Ensaio de bloqueio da ligação de FH e sIgA por citometria de fluxo

Foi avaliada a capacidade de IgG anti-PspC3 e IgG anti-PspC5 em bloquear a ligação de FH à superfície intacta de *S. pneumoniae*. Os isolados foram cultivados e incubados previamente com IgG anti-PspC, seguindo-se a incubação com FH e detecção com anticorpo anti-FH. Como controles foram utilizadas as bactérias incubadas apenas com o anticorpo conjugado a FITC, sem a incubação prévia com IgG anti-PspC e a incubação prévia com o IgG anti-Intimina. Podemos observar na Figura 24, que nos isolados clínicos selecionados para esse ensaio, IgG anti-PspC3 e IgG anti-PspC5 não foram capazes de bloquear a ligação de FH via PspC na superfície da bactéria intacta.

Figura 24 - Análise do bloqueio da ligação de FH à superfície de isolados clínicos de pneumococo. IgG anti-PspC3, IgG anti-PspC5 e IgG anti-Intimina foram testados por citometria de fluxo quanto à capacidade de bloquear a ligação de FH na superfície intacta do pneumococo. Bactérias incubadas apenas com o anticorpo de detecção conjugado com FITC foram utilizadas como controle e estão indicadas pelas áreas em cinza. Bactérias sem a incubação prévia com IgG anti-PspC (áreas em rosa) ou com incubação prévia de IgG anti-Intimina (linha pontilhada) também foram usadas como controle. Os resultados são apresentados na forma de histograma de intensidade de fluorescência e a mediana da fluorescência total das bactérias está indicada em cada amostra.

Resolvemos então realizar os ensaios de bloqueio da ligação com a bactéria D39-PspA2/PspC3. Podemos observar na Figura 25A, uma inibição parcial da ligação de FH pelo IgG anti-PspC3 na bactéria selvagem. Essa inibição parcial também foi encontrada na bactéria D39 Δ pspA (Figura 25B).

Figura 25 - Análise do bloqueio da ligação de FH à superfície das bactérias D39 selvagem e D39 Δ pspA. IgG anti-PspC3, IgG anti-PspC5 e IgG anti-Intimina foram testados por citometria de fluxo quanto à capacidade de bloquear a ligação de FH na superfície intacta das linhagens D39 selvagem (A) e D39 Δ pspA (B). Bactérias incubadas apenas com o anticorpo de detecção conjugado com FITC foram utilizadas como controle e estão indicadas pelas áreas em cinza. Bactérias sem a incubação prévia com IgG anti-PspC (áreas em rosa) ou com a incubação prévia de IgG anti-Intimina (linha pontilhada) também foram usadas como controle. Os resultados são apresentados na forma de histograma de intensidade de fluorescência e a mediana da fluorescência total das bactérias está indicada em cada amostra. (WT = selvagem)

Também foi avaliada a capacidade de IgG anti-PspC em bloquear a ligação de slgA à superfície intacta de *S. pneumoniae*. Os isolados foram cultivados e incubados previamente com IgG anti-PspC, depois incubados com slgA, seguindo-se detecção com anticorpo anti-slga. Podemos observar na Figura 26, que IgG anti-PspC3 foi capaz de diminuir a ligação de slgA apenas na superfície do isolado HU19A-PspC5 (Figura 26C). Nas bactérias HU6A-PspC3 (Figura 26A) e na bactéria

HU9V-PspC3 (Figura 26B) observamos que IgG anti-PspC3 e anti-PspC5 não foram capazes de diminuir a ligação de sIgA à superfície da bactéria, mantendo o mesmo perfil observado nos controles.

Figura 26 - Análise do bloqueio da ligação de sIgA à superfície dos isolados clínicos de pneumococo. IgG anti-PspC3, IgG anti-PspC5 e IgG anti-Intimina foram testados por citometria de fluxo quanto à capacidade de bloquear a ligação de sIgA na superfície intacta do pneumococo. Bactérias incubadas apenas com o anticorpo de detecção conjugado com FITC foram utilizadas como controle e estão indicadas pelas áreas em cinza. Bactérias sem a incubação prévia com IgG anti-PspC (áreas em rosa) ou com a incubação prévia de IgG anti-Intimina (linha pontilhada) também foram usadas como controle. Os resultados são apresentados na forma de histograma de intensidade de fluorescência e a mediana da fluorescência total das bactérias está indicada em cada amostra.

4.13 Avaliação da capacidade dos isolados clínicos em colonizar a nasofaringe dos camundongos

Foram selecionados 7 isolados clínicos de pneumococo (HU1-PspC6, HU3-PspC8, HU6A-PspC3, HU6B-PspC4/PspC10, HU18C-PspC6, HU19A-PspC5 e HU23F-PspC3) para testar a capacidade de colonização da nasofaringe dos camundongos C57BL/6. Neste desafio, 5×10^6 UFC são inoculadas por animal pela via nasal e a colonização é avaliada através do plaqueamento do lavado nasal em placas de ágar sangue, coletados 5 dias após a inoculação da bactéria. Podemos observar na Figura 27 que foram recuperadas bactérias da nasofaringe dos animais desafiados com todos os isolados testados, com exceção dos camundongos que receberam o isolado HU6A-PspC3, que morreram antes do quinto dia. Nos camundongos desafiados com os isolados HU1-PspC6 e HU3-PspC8, um camundongo de cada grupo morreu antes do quinto dia da avaliação.

Figura 27 - Avaliação da capacidade colonizadora dos isolados clínicos do HU-USP. Camundongos C57BL/6 desafiados com os isolados clínicos indicados foram avaliados quanto à colonização da nasofaringe 5 dias após o desafio. O número de UFCs recuperados dos lavados nasais está indicado.

4.14 Indução de anticorpos em animais imunizados com as proteínas recombinantes PspC3 e PspA5

Camundongos C57BL/6 foram imunizados com as proteínas recombinantes PspC3 e PspA5 pela via nasal utilizando-se a vacina wP_{low} como adjuvante e o soro coletado individualmente para a análise da concentração de IgG anti-PspC3 e anti-PspA5 por ELISA. Pode-se observar na Figura 28 que PspC3+ wP_{low} induziu anticorpos IgG anti-PspC3 (Figura 28A) e PspA5+ wP_{low} induziu anticorpos IgG anti-PspA5 (Figura 28B) nos animais imunizados, com maiores níveis detectáveis para anti-PspA5.

Figura 28 - Indução de IgG anti-PspC3 e IgG anti-PspA5 em resposta à imunização nasal com PspC3+ wP_{low} e PspA5+ wP_{low} . Os soros dos camundongos C57BL/6 imunizados com wP_{low} , PspC3+ wP_{low} e PspA5+ wP_{low} foram analisados individualmente por ELISA em placas sensibilizadas com PspC3 (A) e PspA5 (B). A concentração de IgG anti-PspC3 ou anti-PspA5 é mostrada. * Indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais não imunizados e ** indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais imunizados com wP_{low} . (teste *t* de Student $p \leq 0,05$).

4.15 Avaliação da proteção em modelo de colonização da nasofaringe dos camundongos imunizados

Foi avaliada a capacidade protetora da formulação vacinal PspC3+wP_{low}, quando administrada pela via nasal contra as diferentes linhagens de *S. pneumoniae* em modelo de desafio de colonização da nasofaringe dos camundongos C57BL/6 (Figura 29). A formulação PspA5+wP_{low} foi utilizada como um controle positivo, uma vez que dados gerados em nosso laboratório demonstraram uma redução significativa na colonização da nasofaringe com a formulação PspA5+wP e desafio com o isolado 0603 (sorotipo 6B, PspA1 e PspC3) (Oliveira et al.,2010). Na Figura 29A, B e C estão representados os grupos que receberam 6 imunizações e na Figura 30A, B e C estão representados no gráfico os animais que receberam 3 imunizações.

Podemos observar que não houve redução na colonização da nasofaringe dos animais desafiados com o isolados HU23F (Figura 29A), HU19A (Figura 29B), HU18C (Figura 29C) HU6B (Figura 30A) e HU19A (Figura 30B). Já nos animais desafiados com HU23F que receberam 3 imunizações das formulações vacinais (Figura 30C), podemos observar uma redução nos grupos wP_{low} e PspC3+wP_{low} com diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo não-imunizado, mas não foi observada diferença entre os grupos wP_{low} e PspC3+wP_{low}. O gráfico da Figura 30C é a soma de dois experimentos de imunizações e desafio independentes.

Figura 29 - Avaliação da proteção em modelo de colonização da nasofaringe por pneumococo induzida pela imunização nasal (6 doses). Camundongos que receberam 6 imunizações de wP_{low}, PspC3+wP_{low} ou PspA5+wP_{low} foram desafiados com 5×10^6 UFC/camundongo dos isolados indicados acima. Os animais não imunizados e imunizados apenas como adjuvante, wP_{low}, foram utilizados como controle.

A – HU6B **B – HU19A** **C - HU23F**

Figura 30 - Avaliação da proteção em modelo de colonização da nasofaringe por pneumococo induzida pela imunização nasal (3 doses). Camundongos que receberam 3 imunizações (A-C) de wP_{low}, PspC3+wP_{low} ou PspA5+wP_{low} foram desafiados com 5×10^6 UFC/camundongo dos isolados indicados acima. Os animais não imunizados e imunizados apenas como adjuvante, wP_{low}, foram utilizados como controle. * Indica uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo dos animais não imunizados ($P \leq 0,05$ - ANOVA).

4.16 Clonagem, expressão e purificação de pAE-*pspC3ΔFH*

Foi demonstrado que a ligação de FH ao antígeno fHbp (*meningococcal factor H-binding protein* de *Neisseria meningitidis*) leva à uma diminuição da imunogenicidade quando comparada a um mutante que não é capaz de ligar-se ao FH em modelo de camundongo transgênico expressando FH humano (Beernink et al 2011). Neste estudo, foi demonstrado que a proteína mutante que não é capaz de se ligar a FH induziu anticorpos com maior atividade bactericida do que a proteína nativa, com a indução de resposta de anticorpos dirigidos a epítomos que seriam “mascarados” pela ligação de FH à proteína nativa. Decidimos então construir um novo fragmento de PspC3 (nosso melhor candidato vacinal) sem a presença da região consenso de ligação a FH e assim avaliar o impacto dessa deleção nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Para a obtenção do fragmento gênico *pspC3ΔFH*, foi utilizado como DNA molde o fragmento *pspC3* que codifica a região N-terminal em α -hélice até o final da região rica em prolina. Para isso foram realizados duas reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos. A primeira amplificação por PCR originou o fragmento 1 (início da região N-terminal até antes do início da região consenso de ligação a FH, nucleotídeos 1-147) e a segunda amplificação originou o fragmento 2 (início logo após o término da região consenso de ligação a FH até a região rica em prolina, nucleotídeos 183-1203), como podemos observar na Figura 31. O primeiro fragmento possui um sítio de restrição BamHI na extremidade 5' e um sítio XbaI na extremidade 3'. O fragmento 2 possui um sítio XbaI na extremidade 5' e um sítio PstI na extremidade 3'.

Figura 31 - Sequência utilizada como molde para amplificação do gene *pspC3ΔFH*. Em azul e verde, oligonucleotídeos utilizados para amplificar fragmento1. Em vermelho observa-se a região de ligação a FH. Em amarelo é mostrado o oligonucleotídeo *forward* utilizado para amplificar o fragmento 2. A sequência na íntegra encontra-se no Apêndice 2.

Após a purificação dos dois fragmentos, foi realizada a digestão com a enzima de restrição XbaI e uma reação de ligação para a junção dos fragmentos (agora sem a região consenso de ligação a FH). Foi realizada então a amplificação por PCR do fragmento completo utilizando os iniciadores *forward* do fragmento 1 e *reverse* do fragmento 2. O fragmento completo amplificado e purificado foi inserido no vetor pGEM-T Easy. A presença do inserto foi confirmada por análise de restrição (utilizando as enzimas BamHI e PstI) e a sequência confirmada por sequenciamento. O plasmídeo pGEM-T-*pspC3ΔFH* foi digerido com as enzimas específicas. A amostra digerida foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1% e a banda de tamanho correspondente ao esperado (1173 pb), foi cortada e purificada. Esse inserto foi clonado no vetor de expressão em *E. coli* pAE-6xHis.

Células de *E. coli* BL21 (Si) transformadas com o vetor pAE-*pspC3ΔFH* foram cultivadas e induzidas com 300 mM de NaCl para a expressão de PspC3ΔFH. Após a análise da expressão inicial do fragmento, os cultivos foram preparados em maior volume e o sobrenadante do lisado submetido à cromatografia em resina de quelante de Ni²⁺. Frações de todas as etapas da purificação foram coletadas. Após a purificação, todas as frações de lavagens e eluições foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 10% para verificar em qual das frações se encontrava a proteína purificada. Em seguida, essas frações que continham PspC3ΔFH foram dialisadas.

A Figura 32 mostra as proteínas expressas pelos os vetores pAE-*pspC3*, pAE-*pspC3ΔFH* purificadas. As bandas correspondentes às proteínas PspC3, PspC3ΔFH observadas em SDS-PAGE 10% apresentam massa molecular acima do predito, 46,3 kDa e 45,3 kDa, respectivamente. Esse tipo de migração anômala está

descrita na literatura tanto para PspA como para PspC (Brooks-Walter et al., 1999; Yother, Briles, 1992).

Figura 32 - Análise por SDS-PAGE 10% do fragmento de PspC3ΔFH purificado. 1. Padrão de massa molecular; 2. PspC3 recombinante; 3. PspC3ΔFH recombinante.

Também foi realizado o ensaio de *immunoblotting* para confirmar a ausência de ligação de FH na proteína mutante PspC3ΔFH, seguindo o mesmo protocolo de sobreposição utilizado anteriormente. As proteínas recombinantes foram analisadas em gel de SDS-PAGE 10% (proteínas obtidas através da lavagem com cloreto de colina da bactéria 491/00 foram utilizadas como controle positivo), e em seguida, transferida para uma membrana de nitrocelulose. Podemos observar na Figura 33A, que não houve a ligação de FH na proteína PspC3ΔFH, mas houve ligação na proteína nativa e no lavado de colina. Na Figura 33B, observa-se que slgA foi capaz de se ligar nas proteínas recombinante PspC3, PspC3ΔFH e no lavado de colina.

Figura 33 – Análise po *immunoblotting* da interação de FH e slgA com as proteínas recombinantes: PspC3 e PspC3ΔFH. A capacidade de ligação de FH (A) ou slgA (B) nas proteínas recombinantes foi avaliada utilizando-se anticorpo anti-FH e anticorpo anti-slga, respectivamente. 1. PspC3ΔFH (100 ng); 2. PspC3 (100 ng); e 3. Lavado de cloreto de colina da cepa 491/00. A migração do padrão de massa molecular está indicada à direita.

4.17 Avaliação da resposta humoral induzida pelas proteínas recombinantes por ELISA

A produção dos anticorpos policlonais anti-PspC3 e anti-PspC3ΔFH foi induzida através de administração subcutânea de 10 µg da proteína recombinante com hidróxido de alumínio (Alum) como adjuvante, em grupos de seis camundongos da linhagem BALB/c. O primeiro grupo controle recebeu apenas Alum e o segundo grupo controle recebeu Soro Humano (como fonte de FH). Os demais grupos foram imunizados com a proteína recombinante com ou sem a adição de fonte de FH (Soro humano) ou slgA (Sigma-Aldrich) -rPspC3, rPspC3+FH, rPspC3+slgA, rPspC3ΔFH, rPspC3ΔFH+FH e rPspC3ΔFH+slgA e o adjuvante Alum.

Todas as formulações em que foram adicionados o FH ou slgA foram incubadas previamente com as proteínas recombinantes por 30 minutos à temperatura ambiente, no intuito de favorecer a ligação FH ou slgA à proteína PspC. Duas semanas após a terceira imunização, os soros dos camundongos imunizados foram coletados e utilizados para determinar a concentração de IgG total anti-PspC por ELISA (Figura 33).

Figura 34 - Indução de IgG anti-PspC em resposta à imunização subcutânea com as diferentes formulações. Os soros dos camundongos BALB/c após a terceira imunização com Alum, Soro Humano (FH) PspC3, PspC3+FH, PspC3+slgA, PspC3ΔFH, PspC3ΔFH+FH e PspC3ΔFH+slgA foram analisados individualmente por ELISA em placas sensibilizadas com PspC3. * indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais imunizados com Alum; ** indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais imunizados com Soro Humano; *** indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais imunizados com PspC3; \$ indica diferença estatisticamente significativa em relação aos animais imunizados com PspC3ΔFH. (ANOVA $p < 0,05$).

Podemos observar na Figura 34, que todas as formulações apresentaram altos níveis de anti-PspC3. Os grupos imunizados com PspC3 e PspC3ΔFH apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em relação aos animais imunizados com o adjuvante (Alum) e Soro Humano. Também podemos observar que houve uma redução nos níveis de anticorpos com diferença estatisticamente significativa quando os animais receberam as formulações que continham a adição de FH em relação aos animais que receberam apenas as proteínas recombinantes. A hipótese inicial para esse fenômeno seria que a incubação prévia de PspC3 com FH teria mascarado os epítomos imunogênicos de PspC. No entanto, animais imunizados com PspC3ΔFH+FH também apresentaram níveis mais baixos de anticorpos quando comparado ao grupo PspC3ΔFH. Desse modo, concluímos que a incubação com a mistura complexa presente no Soro Humano pode ter levado à diminuição da resposta imune contra PspC. A incubação com slgA purificado também levou a uma redução nos níveis de anticorpos quando comparado aos grupos imunizados somente com PspC3 ou PspC3ΔFH. Concluímos assim que a simples mistura do antígeno PspC com seus ligantes leva a uma diminuição da resposta imune e que a avaliação do impacto da ligação de FH e slgA humanos na

imunogenicidade de PspC deve ser estudado em modelos de camundongos transgênicos.

5 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

Há mais de um século, desde o primeiro isolamento de *S. pneumoniae*, as infecções causadas por esse patógeno continuam sendo grande causa de preocupação, pela sua frequência, morbidade e mortalidade. O *S. pneumoniae* é, provavelmente, o mais importante agente etiológico bacteriano causador das otites médias, sinusites e pneumonia. Essas infecções ocorrem em todas as faixas etárias, sendo mais frequente na infância e nas idades mais avançadas em todo o mundo, e seu controle está entre as prioridades atuais em Saúde Pública. O Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de Imunização, incluiu a vacina conjugada pneumocócica 10-valente no calendário básico de vacinação em abril de 2010 em todo território nacional. Trata-se de um grande avanço para a saúde pública brasileira, uma vez que essa vacina protegerá as crianças menores de 2 anos de idade contra doenças invasivas causadas por pneumococos dos sorotipos, 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. No entanto, estudos realizados após a implementação da vacina 7-valente, evidenciaram um aumento das doenças causadas por sorotipos não vacinais. Diante deste panorama, torna-se indispensável o desenvolvimento de novas formulações vacinais que sejam eficientes e de baixo custo. Uma alternativa neste caso seria o uso de formulações vacinais proteicas.

Um estudo recente analisou o genoma completo de 240 isolados de pneumococos provenientes de uma linhagem resistente a múltiplos antibióticos, e mostrou que, além da região que contém os genes de síntese da cápsula, os *loci* que sofreram maior pressão seletiva com alta taxa de recombinação foram *pspA*, *pspC* e *psrP* (Croucher et al., 2011). Desse modo, para o desenvolvimento de uma formulação vacinal eficaz, é essencial selecionar a melhor molécula (PspA e PspC) capaz de induzir anticorpos com uma ampla cobertura, o que reduziria problemas de recombinação e substituição de isolados mais prevalentes.

Este projeto iniciou-se com o sequenciamento completo do gene de *pspC* e a região CDR de *pspA* de 13 isolados do HU-USP previamente sorotipados, que resultou na classificação do grupo de PspC e clado de PspA. O grupo de PspC foi determinado segundo a classificação proposta por Iannelli e colaboradores (Iannelli et al., 2002) e para determinar o clado do PspA, seguimos a classificação de Hollingshead e colaboradores (Hollingshead et al., 2000). Assim como nos estudos

de Iannelli e colaboradores, PspC do grupo 3 foi o mais encontrado, com 6 isolados dentre os 13 estudados. PspC do grupo 6 foi o segundo mais frequente, com 3 isolados. Também foi observada uma duplicação em *tandem* (PspC4/PspC10). A maioria dos isolados apresentou o motivo de ligação à colina para ancoragem de PspC na superfície da bactéria e 3 isolados (HU3-PspC8, HU6B-PspC10 e HU19F-PspC9) apresentaram a sequência de ancoramento através do motivo LPXTG. É interessante notar que a análise de somente 13 isolados foi capaz de detectar boa parte da diversidade de PspC descrita por Iannelli e colaboradores (Iannelli et al., 2002). O sequenciamento da região CDR de PspA também mostrou concordância com dados da literatura, com aproximadamente metade dos isolados com PspA de família 1 (clados 1 e 2) e metade de família 2 (clados 3 e 4; não foi encontrado o clado 5) (Hollingshead et al., 2000).

Fragmentos contendo a região N-terminal de PspC3, PspC5 e PspC8 foram expressos em *E. coli* na forma solúvel e purificados por cromatografia de afinidade em resina quelante de Ni^{2+} . Após análise por SDS-PAGE, observou-se que PspC3, PspC5 e PspC8 apresentam massa molecular aparente maior do que o predito. A migração anômala tanto de PspC como de PspA por SDS-PAGE está provavelmente associada à presença da região rica em prolinas e já foi descrita na literatura (Yother, Briles, 1992; Brooks-Walter et al., 1999).

As proteínas purificadas foram utilizadas para produção de soros específicos em camundongos. Os soros produzidos foram analisados quanto à reatividade por *immunoblotting* com extratos proteicos de diversos isolados de pneumococo. O soro anti-PspC3 foi o que apresentou maior capacidade em reconhecer os isolados testados. Aparentemente, o soro anti-PspC5 mostrou reatividade cruzada com PspA, já que PspC5 possui uma região homóloga à região CDR de PspA de clado 2 (Brooks-Walter et al. 1999). O soro anti-PspC8 apresentou reconhecimento restrito ao isolado HU3-PspC 8.

A capacidade de IgG anti-PspC3 e anti-PspC5 de ligar-se à superfície da bactéria em isolados de pneumococo expressando PspC de diferentes grupos foi avaliada por citometria de fluxo. De uma forma geral, os resultados obtidos estão de acordo com os dados gerados por *immunoblotting*. IgG anti-PspC3 apresentou ligação a isolados expressando PspC3 e PspC6, enquanto que IgG anti-PspC5 apresentou ligação com isolado expressando o próprio PspC5. IgG anti-PspC5

também ligou-se a um isolado expressando PspC8, mas essa ligação pode ser devida novamente à reatividade cruzada com PspA2 deste isolado.

PspC é uma das várias proteínas de superfície de pneumococo que se ligam a proteínas do hospedeiro, tais como FH e sIgA. Foi demonstrada que a interação com FH do plasma humano aumenta a adesão da bactéria a células epiteliais e endoteliais *in vitro*. Esta interação, que foi mapeada na região N-terminal de PspC, leva ainda a um aumento na invasão da bactéria em pulmões de camundongos (Hammerschmidt et al., 2007; Quin et al., 2007). Por outro lado, também foi demonstrado que a interação de PspC ao FH impede a deposição do componente C3b do sistema complemento à superfície da bactéria e sua consequente opsonização (Dave et al., 2001; Janulczyk et al., 2000). Estudos demonstraram que PspC se liga ao componente secretor da imunoglobulina A humana (Hammerschmidt et al., 1997) através de um motivo hexapeptídico conservado (YRNYPT) dentro da região de α -hélice de PspC (Hammerschmidt et al., 2000). A ligação de PspC ao receptor polimérico de Imunoglobulina (pIgR) parece promover a invasão e migração do pneumococo através do epitélio da nasofaringe (Balachandran et al., 2002; Zhang et al., 2000). Estes dados confirmam o papel do antígeno PspC durante as fases de colonização e invasão do patógeno. Foi demonstrado ainda que FH e sIgA não competem pela ligação ao PspC, pois não compartilham o mesmo sítio de ligação. Desta maneira FH e sIgA podem ligar-se simultaneamente na região de α -hélice de PspC (Dave et al., 2004).

Neste trabalho, a interação de FH e sIgA com os diferentes extratos proteicos foi avaliada por *immunoblotting* e citometria de fluxo. No ensaio de *immunoblotting*, observamos que apenas um isolado não apresentou ligação com FH (HU19F-PspC9). Os demais isolados apresentaram ligação com FH, mas com diferentes intensidades. Dados obtidos por Lu e colaboradores sugerem que uma sequência de 12 aminoácidos (ALNIKLSAIKTK) contém o sítio de ligação para FH humano. Alguns aminoácidos são altamente conservados (aminoácidos em negrito - Leucina (posição 2), Leucina (posição 6), Isoleucina (posição 9) e Lisina (posição 10)), enquanto que os outros aminoácidos variam em diferentes graus (Lu et al., 2006). Ao avaliarmos as sequências preditas de PspC dos 13 isolados, observamos que todos os isolados continham ao menos 2 aminoácidos altamente conservados da sequência consenso de ligação a FH. Por outro lado, quando analisamos a interação

dos extratos proteicos com slgA observamos a ausência dessa ligação em alguns isolados (HU3-PspC8, HU5-PspC3, HU6B-PspC4/PspC10, HU19A-PspC5 e HU19F-PspC9). O alinhamento com a sequência consenso de 6 aminoácidos (Y(H/R)RNYPT) para ligação de slgA mostrou-se ausente nos isolados HU3-PspC8, HU6B-PspC10 e HU19F-PspC9, o que vai de acordo com dados publicados mostrando que variantes de PspC dos grupos 8 a 11 não apresentam essa sequência consenso. (Iannelli et al., 2002). Já nos ensaios de citometria de fluxo, o FH foi capaz de ligar-se na maioria das bactérias testadas, com exceção do isolado HU19A, que também apresentou uma baixa interação no ensaio de *Immunoblotting*. Já nos ensaios de citometria de fluxo para avaliar a ligação de slgA, foi observada ligação na superfície de 3 das 5 bactérias testadas. É importante ressaltar que uma grande diferença entre os ensaios de ligação de FH e slgA na bactéria intacta por citometria de fluxo e nos extratos proteicos por *immunoblotting* é a influência da composição e da espessura da cápsula polissacarídica de cada isolado testado na bactéria intacta, podendo impedir a ligação desses componentes a PspC.

Também avaliamos a capacidade dos IgG anti-PspC3 e IgG anti-PspC5 em bloquear a ligação de FH e slgA através dos ensaios de *immunoblotting* e citometria de fluxo. Nos ensaios de *immunoblotting*, observamos que a maior redução na ligação de FH com os extratos proteicos de pneumococo foi na membrana incubada previamente com IgG anti-PspC5, com bloqueio quase completo da ligação de FH no isolado HU19A-PspC5. Quando a ligação de slgA foi avaliada, IgG anti-PspC3 levou a uma maior redução na ligação de slgA do que IgG anti-PspC5 nos extratos proteicos testados.

Nos ensaios de citometria de fluxo, o bloqueio da ligação de FH ou slgA foi observado em apenas alguns isolados testados, demonstrando a dificuldade e possíveis limitações dessa técnica. Não foi possível observar o bloqueio da ligação de FH aos isolados clínicos, mas foi observada uma sutil inibição na ligação de FH nas bactérias D39 selvagem e D39 Δ pspA (PspC3) quando as bactérias foram incubadas previamente com IgG anti-PspC3. Quando foi analisado o bloqueio de ligação de slgA nos isolados clínicos, apenas o isolado HU19A-PspC5 apresentou uma inibição da ligação de slgA na superfície da bactéria quando previamente incubada com IgG anti-PspC3. Os resultados obtidos demonstram que existem interações complexas da cápsula polissacarídica e fatores de virulência na superfície

de cada isolado de pneumococo, que podem influenciar nossos resultados, dificultando o bloqueio da ligação de FH ou sIgA através dos anticorpos anti-PspC. Estes dados estão de acordo com os resultados que demonstram que PspC é um fator determinante na virulência sistêmica e pulmonar de *S. pneumoniae*, mas os seus efeitos são influenciados pela cepa de pneumococo analisada (Kerr et al., 2006).

Foi demonstrado que a imunização nasal com PspC leva à proteção de camundongos contra desafio intranasal de colonização (Balachandran et al., 2002), enquanto que a imunização parenteral de PspC com diferentes adjuvantes leva à proteção contra desafio intraperitoneal (Ogunniyi et al., 2001). A mistura dos antígenos PspA e PspC parece induzir níveis maiores de proteção contra desafio intraperitoneal (Ogunniyi et al., 2007b). Com base nesses resultados e nos dados apresentados neste trabalho, decidimos utilizar a proteína recombinante PspC3 em uma formulação vacinal para imunização de camundongos, uma vez que esta proteína apresentou os melhores resultados, com maior reatividade cruzada com os isolados testados. A proteína recombinante PspC3 foi administrada juntamente com a vacina celular pertussis *low*, (wP_{low}), como adjuvante. Dados gerados pelo nosso grupo demonstraram que quando combinada com o antígeno PspA5 e administrada pela via nasal em camundongos, a vacina wP (vacina celular pertussis tradicional) apresenta atividade adjuvante, estimulando o sistema imune sistêmico e de mucosa e conferindo proteção contra o modelo de desafio colonização por pneumococo (Oliveira et al., 2010). PspA5 foi, portanto, utilizada como controle positivo nos experimentos de colonização da nasofaringe. Como o modelo de desafio de colonização da nasofaringe pela via intranasal já havia sido estabelecido pelo nosso laboratório apenas com a cepa 0603 (Ferreira et al., 2010; Hernani Mde et al., 2011; Oliveira et al., 2010), foi necessária a realização de uma triagem com os novos isolados clínicos. Foi possível recuperar bactérias da nasofaringe dos animais 5 dias após desafio com 6 dos 7 isolados avaliados, mas os animais que foram inoculados com o isolado HU6A-PspC3 morreram antes do quinto dia após o desafio. Os animais imunizados com as formulações vacinais foram então desafiados com os isolados clínicos, mas não observamos uma redução na colonização da nasofaringe com diferença estatisticamente significativa. Apenas o grupo que recebeu 3 doses da formulação PspC3+ wP_{low} e o grupo controle que recebeu wP_{low} apresentaram

uma redução com diferença estatisticamente significativa na colonização da nasofaringe quando desafiados com o isolado HU23F e comparados ao grupo sem imunização.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem a utilização de PspC3 em uma formulação vacinal, pois apresentaria uma ampla cobertura, induzindo anticorpos capazes de reconhecer diferentes grupos de PspC. Uma inibição parcial na ligação de FH e sIgA à superfície da bactéria foi observada nos experimentos *in vitro* através da pré-incubação com IgG anti-PspC. Não foi observada, no entanto, proteção significativa após imunização nasal de camundongos com PspC3 e desafio de colonização da nasofaringe. É importante ressaltar que a interação de PspC é específica para o FH humano (Lu et al., 2008) e sIgA humano (Hammerschmidt et al., 2000) e que os vários modelos murinos de desafio com pneumococo verificam apenas a capacidade dos anticorpos anti-PspC em opsonizar as bactérias e mediar a subsequente fagocitose, mas não levam em conta o bloqueio da função de PspC.

Recentemente, um modelo de camundongo transgênico expressando FH humano foi utilizado para avaliar a imunogenicidade da proteína ligadora de FH de meningococo (fHbp). Neste estudo, foi demonstrado que a proteína mutante que não é capaz de se ligar a FH induziu anticorpos com maior atividade bactericida do que a proteína nativa, com a indução de resposta de anticorpos dirigidos a epítomos que seriam “mascarados” pela ligação de FH à proteína nativa (Beernink et al., 2011). A utilização de modelos de camundongos transgênicos seria, portanto, uma estratégia importante para avaliação de antígenos de pneumococos que apresentam interações específicas com proteínas humanas.

Com o intuito de investigar melhor o impacto dessa região consenso de ligação a FH presente em PspC, decidimos remover essa região da proteína PspC3, uma vez que não há disponibilidade do modelo animal transgênico em nosso laboratório. Obtivemos a proteína recombinante PspC3ΔFH, que foi utilizada para imunizar camundongos. Os camundongos foram imunizados tanto com a proteína nativa (PspC3) quanto com a proteína mutante (PspC3ΔFH) com ou sem a incubação prévia com sIgA comercial purificada ou soro humano como fonte de FH. O racional desse experimento seria que a incubação de PspC3 com FH levaria a uma diminuição na imunogenicidade da molécula enquanto que PspC3ΔFH não seria afetada. Embora uma diminuição nos níveis de anticorpos tenha sido

observada após a incubação de PspC3 com FH, o mesmo fenômeno foi observado com PspC3ΔFH. O mesmo resultado foi obtido após a incubação com sIgA. Concluimos, portanto, que a simples mistura do antígeno PspC com sIgA ou FH pode levar a uma diminuição da resposta imune, independentemente da capacidade de ligação de PspC a esses fatores humanos. Desse modo, camundongos transgênicos continuam sendo os modelos ideais para a avaliação do impacto da ligação de FH e sIgA humanos na imunogenicidade de PspC.

Podemos concluir a partir dos resultados obtidos, que mesmo com todas as limitações nas técnicas utilizadas e a falta de um modelo animal ideal, o fragmento PspC3 é um candidato vacinal com um forte potencial, capaz de apresentar uma ampla reatividade contra diferentes isolados de pneumococo, e deveria ser considerado em uma formulação vacinal contra infecções causadas por pneumococo.

REFERÊNCIAS*

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

AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev*. 1995;59:591-603.

Arnold RR, Brewer M, Gauthier JJ. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganisms. *Infect Immun*. 1980;28:893-8.

Balachandran P, Brooks-Walter A, Virolainen-Julkunen A, Hollingshead SK, Briles DE. Role of pneumococcal surface protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2002;70:2526-34.

Beernink PT, Shaughnessy J, Braga EM, Liu Q, Rice PA, Ram S, Granoff DM. A meningococcal factor H binding protein mutant that eliminates factor H binding enhances protective antibody responses to vaccination. *J Immunol* 2011;186:3606-14.

Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, Elvin L, Ensor KM, Hackell J, Siber G, Malinoski F, Madore D, Chang I, Kohberger R, Watson W, Austrian R, Edwards K. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19:187-95.

Black S, Eskola J, Whitney C, Shinefield H. Pneumococcal conjugate vaccine and pneumococcal common protein vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein W, Offit P, editors. *Vaccines*. Philadelphia: WB Saunders; 2008. p. 531-67.

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

Briles DE, Ades E, Paton JC, Sampson JS, Carlone GM, Huebner RC, Virolainen A, Swiatlo E, Hollingshead SK. 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*. 2000;68:796-800.

Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, van Ginkel FW, Benjamin WH, Jr. 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;188:339-48.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Brooks-Walter A, Briles DE, Hollingshead SK. The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*. 1999;67:6533-42.

Calix JJ, Nahm MH. A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect. Dis*. 2010;202:29-38.

Castaneda E, Agudelo CI, Regueira M, Corso A, Brandileone MC, Brandao AP, Maldonado A, Hormazabal JC, Martinez IT, Llanes R, Sanchez J, Feris JM, Echaniz-Aviles G, Carnalla-Barajas MN, Terrazas MG, Monroy IH, Chamorro G, Weiler N, Camou T, Gabarrot GG, Spadola E, Payares D, Gabastou JM, Di Fabio JL, de la Hoz F. Laboratory-based surveillance of *Streptococcus pneumoniae* invasive disease in children in 10 Latin American countries: a SIREVA II project, 2000-2005. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28:e265-70.

CDC - Effects of new penicillin susceptibility breakpoints for *Streptococcus pneumoniae* - United States, 2006-2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2008; 57:1353-5.

Cheng Q, Finkel D, Hostetter MK. Novel purification scheme and functions for a C3-binding protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry* 2000;39:5450- 7.

Constenla DO. Economic impact of pneumococcal conjugate vaccination in Brazil, Chile, and Uruguay. *Rev Panam Salud Publica*. 2008;24:101-12.

Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail MA, Burton J, van der Linden M, McGee L, von Gottberg A, Song JH, Ko KS, Pichon B, Baker S, Parry CM, Lambertsen LM, Shahinas D, Pillai DR, Mitchell TJ, Dougan G, Tomasz A, Klugman KP, Parkhill J, Hanage WP, Bentley SD. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* 2011;331:430-4.

Dagan LM. Changing the ecology of pneumococci with antibiotics and vaccines. In: MT Tuomanen E, Morrison DA, Spratt BG, editors. *The pneumococcus*. Washington, D.C.: ASM; 2004. p. 283-313.

Dagan R, Kayhty H, Wuorimaa T, Yaich M, Bailleux F, Zamir O, Eskola J. Tolerability and immunogenicity of an eleven valent mixed carrier *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-diphtheria toxoid or tetanus protein conjugate vaccine in Finnish and Israeli infants. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:91-8.

Dagan R, Muallem M, Melamed R, Leroy O, Yagupsky P. Reduction of pneumococcal nasopharyngeal carriage in early infancy after immunization with tetravalent pneumococcal vaccines conjugated to either tetanus toxoid or diphtheria toxoid. *Pediatr Infect Dis J*. 1997;16:1060-4.

Darrieux M, Moreno AT, Ferreira DM, Pimenta FC, de Andrade AL, Lopes AP, Leite LC, Miyaji EN. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. *J Med Microbiol*. 2008;57:273-8.

Dave S, Brooks-Walter A, Pangburn MK, McDaniel LS. PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun*. 2001;69:3435-7.

Dave S, Carmicle S, Hammerschmidt S, Pangburn MK, McDaniel LS. Dual roles of PspC, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, in binding human secretory IgA and factor H. *J Immunol*. 2004;173:471-7.

de OMAP, Campos LC, dos Santos MS, Azevedo J, Dos Santos RC, Carvalho Mda G, Beall BW, Martin SW, Salgado K, Reis MG, Ko AI, Reis JN. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* prior to introduction of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil, 2000-2007. *Vaccine*. 2011;29:1139-44.

Di Fabio JL, Castaneda E, Agudelo CI, De La Hoz F, Hortal M, Camou T, Echaniz-Aviles G, Noemi M, Barajas C, Heitmann I, Hormazabal JC, Brandileone MC, Dias Vieira VS, Regueira M, Ruvinski R, Corso A, Lovgren M, Talbot JA, De Quadros C. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigia Group, 1993 to 1999. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan American Health Organization. *Pediatr Infect Dis J*. 2001;20:959-67

Dias CA, Teixeira LM, Carvalho Mda G, Beall B. Sequential multiplex PCR for determining capsular serotypes of pneumococci recovered from Brazilian children. *J Med Microbiol*. 2007;56:1185-8

Dieudonne-Vatran A, Krentz S, Blom AM, Meri S, Henriques-Normark B, Riesbeck K, Albiger B. Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* bind the complement inhibitor C4b-binding protein in a PspC allele-dependent fashion. *J Immunol*. 2009;182:7865-77.

Eskola J, Anttila M. Pneumococcal conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18:543-51.

Esteva C, Selva L, de Sevilla MF, Garcia-Garcia JJ, Pallares R, Munoz-Almagro C. *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 causing invasive disease among children in Barcelona over a 20-year period (1989-2008). *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1441-4.

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

Ferreira DM, Jambo KC, Gordon SB. Experimental human pneumococcal carriage models for vaccine research. *Trends Microbiol*. 2011;19:464-70.

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

Gamez G, Hammerschmidt S. Combat pneumococcal infections: adhesins as candidates for protein-based vaccine development. *Curr Drug Targets*. 2012;13:323-37.

Hammerschmidt S. Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Curr Opin Microbiol*. 2006;9:12-20.

Hammerschmidt S, Agarwal V, Kunert A, Haelbich S, Skerka C, Zipfel PF. The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J Immunol*. 2007;178:5848-58.

Hammerschmidt S, Talay SR, Brandtzaeg P, Chhatwal GS. SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol*. 1997;25:1113-24.

Hammerschmidt S, Tillig MP, Wolff S, Vaerman JP, Chhatwal GS. Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol Microbiol*. 2000;36:726-36.

Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis*. 2000;30:100-21.

Hausdorff WP, Feikin DR, Klugman KP. Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. *Lancet Infect Dis*. 2005;5:83-93.

Hausdorff WP, Siber G, Paradiso PR. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. *Lancet* 2001;357:950-2.

Hernani Mde L, Ferreira PC, Ferreira DM, Miyaji EN, Ho PL, Oliveira ML. Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the pneumococcal surface protein C primes the immune system and decreases pneumococcal nasopharyngeal colonization in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;62:263-72.

Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, Jackson D, Thomas A, Beall B, Lynfield R, Reingold A, Farley MM, Whitney CG. 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*. 2007;196:1346-54.

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

Iannelli F, Oggioni MR, Pozzi G. Allelic variation in the highly polymorphic locus *pspC* of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* 2002;284:63-71.

Janulczyk R, Iannelli F, Sjöholm AG, Pozzi G, Björck L. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J Biol Chem*. 2000;275:37257-63.

Jarva H, Janulczyk R, Hellwage J, Zipfel PF, Björck L, Meri S. *Streptococcus pneumoniae* evades complement attack and opsonophagocytosis by expressing the *pspC* locus-encoded Hic protein that binds to short consensus repeats 8-11 of factor H. *J Immunol*. 2002;168:1886-94.

Jefferson T, Ferroni E, Curtale F, Giorgi Rossi P, Borgia P. *Streptococcus pneumoniae* in western Europe: serotype distribution and incidence in children less than 2 years old. *Lancet Infect Dis*. 2006;6:405-10.

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

Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL, Romero JR, Bradley JS, Tan TQ, Hoffman JA, Givner LB, Mason EO, Jr. Early Trends for Invasive Pneumococcal Infections in Children After the Introduction of the 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:203-7.

Kaplan SL, Mason EO, Jr., Wald E, Tan TQ, Schutze GE, Bradley JS, Givner LB, Kim KS, Yogev R, Barson WJ. Six year multicenter surveillance of invasive pneumococcal infections in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2002;21:141-7.

Kerr AR, Paterson GK, McCluskey J, Iannelli F, Oggioni MR, Pozzi G, Mitchell TJ. The contribution of PspC to pneumococcal virulence varies between strains and is accomplished by both complement evasion and complement-independent mechanisms. *Infect Immun*. 2006;74:5319-24.

Klugman KP, Madhi SA, Huebner RE, Kohberger R, Mbelle N, Pierce N. A trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in children with and those without HIV infection. *N Engl J Med*. 2003;349:1341-8.

Laval CB, de Andrade AL, Pimenta FC, de Andrade JG, de Oliveira RM, Silva SA, de Lima EC, Fabio JL, Casagrande ST, Brandileone MC. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:50-5.

Leach AJ, Morris PS, McCallum GB, Wilson CA, Stubbs L, Beissbarth J, Jacups S, Hare K, Smith-Vaughan HC. Emerging pneumococcal carriage serotypes in a high-risk population receiving universal 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent polysaccharide vaccine since 2001. *BMC Infect Dis*. 2009;9:121.

Li J, Glover DT, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. PspA and PspC minimize immune adherence and transfer of pneumococci from erythrocytes to macrophages through their effects on complement activation. *Infect Immun*. 2007;75:5877-85.

Lu L, Ma Y, Zhang JR. *Streptococcus pneumoniae* recruits complement factor H through the amino terminus of CbpA. J Biol Chem 2006;281:15464-74.

Lu L, Ma Z, Jokiranta TS, Whitney AR, DeLeo FR, Zhang JR. Species-specific interaction of *Streptococcus pneumoniae* with human complement factor H. J Immunol. 2008;181:7138-46.

Mangtani P, Cutts F, Hall AJ. Efficacy of polysaccharide pneumococcal vaccine in adults in more developed countries: the state of the evidence. Lancet Infect Dis. 2003;3:71-8.

Mantese OC, de Paula A, Almeida VV, de Aguiar PA, Wolkers PC, Alvares JR, Almeida SC, Guerra ML, Brandileone MC. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. J Pediatr. 2009;85.

McEllistrem MC. Genetic diversity of the pneumococcal capsule: implications for molecular-based serotyping. Future Microbiol. 2009;4:857-65.

Miller E, Andrews NJ, Waight PA, et al. Effectiveness of the new serotypes in the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. Vaccine. 2011;29:9127–31.

Moreno AT, Oliveira ML, Ferreira DM, Ho PL, Darrieux M, Leite LC, Ferreira JM, Jr., Pimenta FC, Andrade AL, Miyaji EN. 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;17:439-46.

Novaes HM, Sartori AM, Soares PC. Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004 - 2006. Rev Saude Publica, 2011.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. Lancet. 2009;374:893-902.

Ogunniyi AD, Grabowicz M, Briles DE, Cook J, Paton JC. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2007a;75:350-7.

Ogunniyi AD, LeMessurier KS, Graham RM, Watt JM, Briles DE, Stroehrer UH, Paton JC. Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. Infect Immun. 2007b;75:1843-51.

Ogunniyi AD, Woodrow MC, Poolman JT, Paton JC. Protection against *Streptococcus pneumoniae* elicited by immunization with pneumolysin and CbpA. Infect Immun. 2001;69:5997-6003.

Oliveira ML, Miyaji EN, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PC, Lima FA, Santos FL, Sakauchi MA, Takata CS, Higashi HG, Raw I, Kubrusly FS, Ho PL. Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. *PLoS One*. 2010;5:e10863.

Pai R, Gertz RE, Beall B. Sequential multiplex PCR approach for determining capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol*. 2006;44:124-31.

Park IH, Park S, Hollingshead SK, Nahm MH. Genetic basis for the new pneumococcal serotype, 6C. *Infect Immun*. 2007;75:4482-9.

Pelton SI, Dagan R, Gaines BM, Klugman KP, Laufer D, O'Brien K, Schmitt HJ. Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an interactive symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Vaccine*. 2003;21:1562-71.

Pelton SI, Huot H, Finkelstein JA, Bishop CJ, Hsu KK, Kellenberg J, Huang SS, Goldstein R, Hanage WP. Emergence of 19A as virulent and multidrug resistant *Pneumococcus* in Massachusetts following universal immunization of infants with pneumococcal conjugate vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:468-72.

Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Schaffner W, Craig AS, Smith PJ, Beall BW, Whitney CG, Moore MR. Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J Infect Dis*. 2010;201:32-41.

Prymula R, Peeters P, Chrobok V, Kriz P, Novakova E, Kaliskova E, Kohl I, Lommel P, Poolman J, Prieels JP, Schuerman L. Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable *Haemophilus influenzae*: a randomised double-blind efficacy study. *Lancet*. 2006;367:740-8.

Quadros CA, Whitney C, Andrus J, Levine O. Second Regional Symposium. 2006, São Paulo, SP, Brasil.

Quin LR, Carmicle S, Dave S, Pangburn MK, Evenhuis JP, McDaniel LS. *In vivo* binding of complement regulator factor H by *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2005;192:1996-2003.

Quin LR, Onwubiko C, Moore QC, Mills MF, McDaniel LS, Carmicle S. Factor H binding to PspC of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to human cell lines *in vitro* and enhances invasion of mouse lungs *in vivo*. *Infect Immun*. 2007;75:4082-7.

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

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

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;71:75-85.

Rosenow C, Ryan P, Weiser JN, Johnson S, Fontan P, Ortqvist A, Masure HR. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 1997;25:819-29.

Sambrook J, Fritsch, E.F. e Maniatis, T. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Elsevier Inc.; 1990.

Scott DA, Komjathy SF, Hu BT, Baker S, Supan LA, Monahan CA, Gruber W, Siber GR, Lockhart SP. Phase 1 trial of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. *Vaccine*. 2007.

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

Singleton RJ, Hennessy TW, Bulkow LR, Hammitt LL, Zulz T, Hurlburt DA, Butler JC, Rudolph K, Parkinson A. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. *Jama*. 2007;297:1784-92.

Smith BL, Hostetter MK. C3 as substrate for adhesion of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2000;182:497-508.

Swiatlo E, Brooks-Walter A, Briles DE, McDaniel LS. Oligonucleotides identify conserved and variable regions of *pspA* and *pspA*-like sequences of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene*. 1997;188:279-84.

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

Tai SS, Lee CJ, Winter RE. Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 1993;61:5401-5.

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

van Gils EJ, Veenhoven RH, Hak E, Rodenburg GD, Keijzers WC, Bogaert D, Trzcinski K, Bruin JP, van Alphen L, van der Ende A, Sanders EA. Pneumococcal conjugate vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. *JAMA*. 2010;304:1099-106.

Voss S, Hallstroem T, Saleh M, Burchhardt G, Pribyl T, Singh B, Riesbeck K, Zipfel PF, Hammerschmidt S. The choline-binding protein PspC of *Streptococcus pneumoniae* interacts with the C-terminal heparin-binding domain of vitronectin. *J Biol Chem*. 2013.

Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, O'Brien KL, Campbell H, Black RE. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. *Lancet*; 2013;381:1405-16.

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

Whitney CG, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Lynfield R, Reingold A, Cieslak PR, Pilishvili T, Jackson D, Facklam RR, Jorgensen JH, Schuchat A. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. *N Engl J Med*. 2003;348:1737-46.

Yoshioka CR, Martinez MB, Brandileone MC, Ragazzi SB, Guerra ML, Santos SR, Shieh HH, Gilio AE.. Analysis of invasive pneumonia-causing strains of *Streptococcus pneumoniae*: serotypes and antimicrobial susceptibility. *J Pediatr*. 2011;87:70-5.

Yother J. Capsules. In: Tuomanen E, Mitchell TJ, Morrison DA, Spratt BG, editors. *The pneumococcus*. Washington, D.C: ASM; 2004. p. 30-48.

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

Zhang JR, Mostov KE, Lamm ME, Nanno M, Shimida S, Ohwaki M, Tuomanen E. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 2000;102:827-37.

APÊNDICES

APÊNDICE A- Alinhamento das sequências de PspC.

D39-	PspC3	-----	
HU1-	PspC6	-----	
HU3-	PspC8	-----	
HU4-	PspC3	-----	
HU5-	PspC3	-----	
HU6A-	PspC3	-----	
HU6B-	PspC4	-----	
HU6B-	PspC10	1 TEREGSTQAATSSKMANESQIERRKAAEQAIIVSLSGYMTSLNDGLDTSDSRFEELLKRAKGIVEEYRKKIDGASDREKI	80
HU7F-	PspC6	-----	
HU9V-	PspC3	-----	
HU14-	PspC3	-----	
HU18C-	PspC6	-----	
HU19A-	PspC5	-----	
HU19F-	PspC9	-----	
HU23F-	PspC3	-----	
D39-	PspC3	-----	
HU1-	PspC6	-----	
HU3-	PspC8	-----	
HU4-	PspC3	-----	
HU5-	PspC3	-----	
HU6A-	PspC3	-----	
HU6B-	PspC4	-----	
HU6B-	PspC10	81 EKLQQEGQTKLDELVDKFKGLSSSEQNGHATPKDPSRNDGVQGGDDSSVGQGEQPGASNQKNPESVPPTASGETDSPTKP	160
HU7F-	PspC6	-----	
HU9V-	PspC3	-----	
HU14-	PspC3	-----	
HU18C-	PspC6	-----	
HU19A-	PspC5	-----	
HU19F-	PspC9	-----	
HU23F-	PspC3	-----	
D39-	PspC3	1 -----TENEGS	6
HU1-	PspC6	1 -----EGVGG	5
HU3-	PspC8	1 -----TENEGS	6
HU4-	PspC3	1 -----TEKEVT	6
HU5-	PspC3	1 -----TEN	3
HU6A-	PspC3	1 -----TENEGS	6
HU6B-	PspC4	1 -----EGVRS	5
HU6B-	PspC10	161 KTSNDSVNSLERELKEVKETAKTTLTNTYMLTRLKQENPGVFWFADLLRESKESVEKYKRMFDEASSKENVENLVKEAQE	240
HU7F-	PspC6	1 -----EGVRS	5
HU9V-	PspC3	1 -----TEKEVT	6
HU14-	PspC3	1 -----TEKEVT	6
HU18C-	PspC6	1 -----EEVGG	5
HU19A-	PspC5	1 -----TENEGI	6
HU19F-	PspC9	1 -----TEKEGS	6
HU23F-	PspC3	1 -----TENEGS	6
D39-	PspC3	7 TQAATSSNMA---KT-----EHRKAAKQV-----VDEYIEKMLREIQ--LDRRK--HTQNVAFNMKLSAIKT	61
HU1-	PspC6	6 RNTSTVTSSGQD-----TSKKYADEV-----KSHYQSILEKVRKSLEKDR--HTQNVGLITKLSSEIKK	61
HU3-	PspC8	7 TQAATFSNMANKSQTEQ--GQINIERDKAKTAV-----SEYKEKKVSEIYTKLERDR--HKDITVDLVNKLQEIKN	72
HU4-	PspC3	7 TQVATSSNKANKSQT-----EHMKAQKQV-----DEYIKKKL---Q--LDRRK--HTQNVGLLTKLGVIKT	60
HU5-	PspC3	4 EGTQTQVATSSNK-----ANKSQTEHM-----KAAQV--VDEYIKKMLQLDRRKHTQNVGLLTKLGAIKT	60
HU6A-	PspC3	7 TQAATSSNMA---KT-----EHRKAAKQV-----VDEYIEKMLREIQ--LDRRK--HTQNVAFNMKLSAIKT	61
HU6B-	PspC4	6 KNNLTVTSSGQD-----ISKKYADEV-----ESHLQSIKLDVNKNLKKVQ--HTQNVDFNKKLSRIKT	61
HU6B-	PspC10	241 IEALVVKHKGR-----EIDLERTKAKTVI-----AKYLTGLLDDIKKNLKKEQ--HINTVELIKKLGDIKR	299
HU7F-	PspC6	6 GNNSTVTSSG---QD-----ISKKYADEV-----KSHLEKILSEIQTNLDRSK--HIKTVNLINKLQDIKR	61
HU9V-	PspC3	7 TQVATSSNKANKSQT-----EHMKAQKQV-----DEYIKKKL---Q--LDRRK--HTQNVGLLTKLGVIKT	60
HU14-	PspC3	7 TQVATSSNKANKSQT-----EHMKAQKQV-----DEYIKKKL---Q--LDRRK--HTQNVGLLTKLGVIKT	60
HU18C-	PspC6	6 RNTPTVTSSG---QD-----ISKKYADEV-----KSHLEEMLSGIK--LDRRK--HTQNFNFNMKLSIIQT	59
HU19A-	PspC5	7 TQVATSYNKANESQT-----EHRKAAQVDEDIKKMLSEIQEYIKKMLSEIQ--LDRRK--HTQNVNINRKLSAIQT	74
HU19F-	PspC9	7 TQAATSFNRGNGSQAEQRGELDLERDKAMDAV-----SEYVGKMVRDAYVKSDRKR--HKNTVALVNQLGNIKN	73
HU23F-	PspC3	7 TQAATSSNMA---KT-----EHRKAAKQV-----VDEYIEKMLREIQ--LDRRK--HTQNVAFNMKLSAIKT	61
D39-	PspC3	62 KLYRELNVL---EEKSKDE-LPSEIKAKLDAAFEQFKKDTL--KPGEKVAEAKKKVVEEAKKKAEDQKEEDRRNYPTNTYK	135
HU1-	PspC6	62 KLYLELVNVLLLEEKSKAE-LPSKAKAEADAQFEQFKKEP-----SSSSS-----	100
HU3-	PspC8	73 EYLNKIVEST---SKIEIQG-LITTSRSKLDEAVSKYKKAPS-----SSSSS-----	115
HU4-	PspC3	61 EYLNHGLSVS---KKKSEAE-LPSEIKAKLDAAFEQFKKDTLPTEPGKKVAEAEKKVVEEAKKKAEDQKEKDRLRNYPTNTYK	136
HU5-	PspC3	61 EYLNHGLSVS---KEKSEAE-LPSKIKAEADAFAENFKKDTL-----SSSSS-----	97
HU6A-	PspC3	62 EYLYGL-----KEKSEAE-LPSEVKAKLDAAFEQFKKDTL--KLGEKVAEAEKKVVEEAKKKAQKEGDRRNYPTITYK	132
HU6B-	PspC4	62 KLYLYGLKEKS---EAE LTL-KTKETKEELTAAFEQFKKDTL-----KSGKKVAEAEKKKAKAQKEEDRRRNYPTNTYK	128
HU6B-	PspC10	300 TYLYKFDEST---QKAQLQE-LVTESQSKLDEAFSFKFKNGLS-----SSSSS-----	342
HU7F-	PspC6	62 TYLYELNVL---EDKSKE-LPSKIKAKLDAAFEQFKKDTLPTEPGKKVAEAEKKVVEEAKKKAQKEEDHRNYPTITYK	137
HU9V-	PspC3	61 EYLNHGLSVS---KKKSEAE-LPSEIKAKLDAAFEQFKKDTLPTEPGKKVAEAEKKVVEEAKKKAEDQKEKDRLRNYPTNTYK	136
HU14-	PspC3	61 EYLNHGLSVS---KKKSEAE-LPSEIKAKLDAAFEQFKKDTLPTEPGKKVAEAEKKVVEEAKKKAEDQKEKDRLRNYPTNTYK	136
HU18C-	PspC6	60 KYFYELNVL---KEKSKEELTSKTKEELTAAFEQFKKDTLKL--GEKVAEAEKKVVEEAKKKAQKEEDRRRNYPTNTYK	134
HU19A-	PspC5	75 KLYLYELRVL---KEKSKEELTSKTKEELTAAFEQFKKEP-----ELTKKLAEAQKAKAQKEEDFRRNYPTNTYK	141
HU19F-	PspC9	74 RYLNEIVHST---SKSQLQE-LMMKSQSEVDEAVSKFEKDSF-----SSSSS-----	116
HU23F-	PspC3	62 EYLYGL-----KEKSEAE-LPSEVKAKLDAAFEQFKKDTL--KLGEKVAEAEKKVVEEAKKKAQKEEDRRRNYPTITYK	132

D39-	PspC3	136	TLELEIAEFDVKVKEAELELVKEEAKE--SRNEGTIKQAKEKVESK-----AEATRLENIKTDRKKAAE	198
HU1-	PspC6		-----	
HU3-	PspC8		-----	
HU4-	PspC3	137	TLELDIAESDVEVKKAELELVKEEAKE--SRDEKKINQAKAKVENKK-----AEATRLKNIKTDREKAAE	199
HU5-	PspC3		-----	
HU6A-	PspC3	133	TLDLEIAESDVEVKKAELELLKEEAK---TRNKDTINQAKAKVESKQ-----AEATRLKKIKTDREQAET	194
HU6B-	PspC4	129	TIELEIAEAEVGVAKAELELEFAQAQVQIPQDTEKINAASKSVEAAK-----SNVKKLEIKISDIEKTYL	193
HU6B-	PspC10		-----	
HU7F-	PspC6	138	TLEPEIAESDVKVKEAELELVKKEADE--SRNEGTTINQAKAKVESEQ-----AEATRLKKIKTDREKAAE	200
HU9V-	PspC3	137	TLELDIAESDVEVKKAELELVKEEAKE--SRDEKKINQAKAKVENKK-----AEATRLKNIKTDREKAAE	199
HU14-	PspC3	137	TLELDIAESDVEVKKAELELVKEEAKE--SRDEKKINQAKAKVENKK-----AEATRLKNIKTDREKAAE	199
HU18C-	PspC6	135	TLELEIAESDGEVKKAELELLKEEA-K--TRNEDTTINQAKAKVESKQ-----AEATRLLEKIKTERKEAEE	196
HU19A-	PspC5	142	TLELEIAEFDVKVKEAELELVKEEAK---PRNEEKIKQAKAKVESKKAETRLEEIKTERKKAAEEAKRKAEESEKKAAE	218
HU19F-	PspC9		-----	
HU23F-	PspC3	133	TLDLEIAESDVEVKKAELELLKEEAK---TRNKDTINQAKAKVESKQ-----AEATRLKKIKTDREQAET	194
D39-	PspC3	199	EA-----KRRADAKLKE-----ANVATSDQGKPKGRAKRGVPGELATP	236
HU1-	PspC6		-----	
HU3-	PspC8	116	---GSSTKPE-TPQ-RKHQN-----	130
HU4-	PspC3	200	-A-----KRRADAKLQE-----ANVATSEQDKSKRRAKREVLGELATP	236
HU5-	PspC3		-----	
HU6A-	PspC3	195	TR-----LENIKTDRKK-----AEEEEAKVKAKPKKRTKRGALGEPATP	232
HU6B-	PspC4	194	YKLDNSTKET--PKPRVRRN-----SP--EIKAKGRVKNYEE-----ANIE-----LSKYMTD	237
HU6B-	PspC10	343	---GSSTKPE-TPQPEKPEH-----	358
HU7F-	PspC6	201	EA-----KRRADAKEQD-----ESKRRKSRGKRGALGEGQATP	232
HU9V-	PspC3	200	-A-----KRRADAKLQE-----ANVATSEQDKSKRRAKREVLGELATP	236
HU14-	PspC3	200	-A-----KRRADAKLQE-----ANVATSEQDKSKRRAKREVLGELATP	236
HU18C-	PspC6	197	EA-----KRRADAKLQE-----ANVATSEQGPKRRVKGALGEGQATP	234
HU19A-	PspC5	219	AKQKVDTKEQGKPKRRAKRGVSGELATPDKKENDAKSSDSSVGEETLPSPSLNMANESQTEHRKDVDEYIKKMLGEIQLD	298
HU19F-	PspC9	117	---GSSTKPE-TPQPENPEH-----	132
HU23F-	PspC3	195	TR-----LENIKTDRKK-----AEEEEAKVKAKPKKRTKRGALGEPATP	232
D39-	PspC3	237	DKK-----ENDAKSSDSSVGEETLPSS-----SLKSGKKVAAEAEKKVVEAEKKAKDQ	283
HU1-	PspC6	101	-----ELTKKVAAEAQKKVVEAEKKAKDQ	123
HU3-	PspC8		-----	
HU4-	PspC3	237	DKK-----ENDARSSDSSVGEETLTSP-----SLKPEKKVAAEAEKKVVEAEKKAKDQ	283
HU5-	PspC3	98	-----KPGKVAEAEKKVVEAEKKAKDQ	120
HU6A-	PspC3	233	DKK-----ENDAKSSDSSVGEETLPSP-----SLKPGKKVAAEAEKKVVEAEKKAKDQ	279
HU6B-	PspC4	238	LYK-----LDNSTKETPKSRVRRN--SP-----QVGDSRELKET--IDKAKETLSTY	280
HU6B-	PspC10		-----	
HU7F-	PspC6	233	DKK-----ENDAKSSDSSVGEETLPSP-----SLKPGKKVAAEAEKKVVEAEKKAKAQ	279
HU9V-	PspC3	237	DKK-----ENDAKSSDSSVGEETLTSP-----SLKPEKKVAAEAEKKVVEAEKKAKDQ	283
HU14-	PspC3	237	DKK-----ENDAKSSDSSVGEETLTSP-----SLKPEKKVAAEAEKKVVEAEKKAKDQ	283
HU18C-	PspC6	235	DKK-----ENDAKSSDSSVGEETLPSP-----SLKPEKKVAAEAEKKVVEAEKKAKAQ	281
HU19A-	PspC5	299	RRKHTQNVNLNKLSAIKTKYLYELSVLKENSKEELTSKTKAELTAAFEQFKKDTLKPEKKVAAEAEKKVVEAEKKAKDQ	378
HU19F-	PspC9		-----	
HU23F-	PspC3	233	DKK-----ENDAKSSDSSVGEETLPSP-----SLKPGKKVAAEAEKKVVEAEKKAKAQ	279
D39-	PspC3	284	KEEDRRNYPTNTYKTLDELEIAESDVKVKEAELELVKEEAKEPRDEEKI-KQAKAKVESKKAETRLENIKTDRKKAE--E	360
HU1-	PspC6	124	KEEDRRNYPTNTYKTIELEIAESDVKVKEAELELLKEEAKEHRDEGTI-KQVEEKVKSEKAEATRLLEKIKTERKKA--E	199
HU3-	PspC8	131	-----QRLNQE-----	136
HU4-	PspC3	284	KEEDRRNYPTNTYKTLDELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKESRNEEKI-KQVKAKVESKKAETRLENIKTDRKKAE--E	361
HU5-	PspC3	121	KEEDRRNYPTNTYKTLELEIAEFDVKVKEAELELVKEEAKEPRDEEKI-KQAKEKVESKKAETRLEKIKTDRKKA--E	196
HU6A-	PspC3	280	KEEDRRNYPTITYKTLELDIAESDVEVKKAELELVKEEAKESRDKEKI-KQAKAEVESKKAETRLEKIKTDRKKAE--E	357
HU6B-	PspC4	281	MVTRLTKLDPSVFWFADLLM--DAKKVVVEYKTKLEDASDKKSVEDLRKEAEGKIESLIVTHQNREKENQPAPOPGGQA	357
HU6B-	PspC10	359	-----QKPTTPAP-----	366
HU7F-	PspC6	280	KEEDRRNYPTNTYKTLLELEIAESDVKVKEAELELVKEEAKESRNEEKI-KQEKAKVESKKAETRLEKIKTDRKKA--E	355
HU9V-	PspC3	284	KEEDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKESRNEEKI-KQVKAKVESKKAETRLENIKTDRKKAE--E	361
HU14-	PspC3	284	KEEDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVEVKKAELELVKEEAKESRNEEKI-KQVKAKVESKKAETRLENIKTDRKKAE--E	361
HU18C-	PspC6	282	KEEDRRNYPTNTYKTLELEIAGSDVEVKKAELELVKEEAKEPRNEEKV-KQAKAEVESKQAEATRLEKIKTDRKKAE--E	358
HU19A-	PspC5	379	KEEDRRNYPTNTYKTLELEIAESDVRVKEAELELVKEEASESRNEEKI-KQAKEKVESKKAETRLEKIKTDRKKAE--E	455
HU19F-	PspC9	133	-----QKPTTPSP-----	140
HU23F-	PspC3	280	KEEDRRNYPTITYKTLELDIAESDVEVKKAELELVKEEAKESRDKEKI-KQAKAEVESKKAETRLEKIKTDRKKAE--E	357
D39-	PspC3	361	EAKRKAAEEDK----VKEK-----	375
HU1-	PspC6	200	EAKRKAAEEDK----VKEK-----	214
HU3-	PspC8		-----	
HU4-	PspC3	362	EAKRRAAEEDK----VKEK-----	376
HU5-	PspC3	197	EAKRKAAEEDK----VKEK-----	211
HU6A-	PspC3	358	EAKRKAAEEDK----VKEK-----	372
HU6B-	PspC4	358	GGSMVPPVPTQTPPSTSQSPGQK--ATEAEKKKLQDLIRQFQEAALNKLD--DEAKTVPDGAKLTGEAGKAYNETRTYAKE	433
HU6B-	PspC10		-----	
HU7F-	PspC6	356	EAKRKAAEEDK----VKEK-----	370
HU9V-	PspC3	362	EAKRRAAEEDK----VKEK-----	376
HU14-	PspC3	362	EAKRRAAEEDK----VKEK-----	376
HU18C-	PspC6	359	EAKRKAAEEDK----VKEK-----	373
HU19A-	PspC5	456	EAKRKAAEESKKAAEAKQKVDAEYALEAKIAELEVEYQRPKEKLEIDESSEDYDLKEGLRAPLQSKLDTTKAKLSKLE	535
HU19F-	PspC9		-----	
HU23F-	PspC3	358	EAKRKAAEEDK----VKEK-----	372

D39-	PspC3	-----		
HU1-	PspC6	-----		
HU3-	PspC8	-----		
HU4-	PspC3	-----		
HU5-	PspC3	-----		
HU6A-	PspC3	-----		
HU6B-	PspC4	434 VVDKSKLLSQTAVTMDLAMQLTKLNDAMSKLKEAKALVPEVKPQENPEPKPQEGEKPSVPDINQEKEKAKLAIAT	513	
HU6B-	PspC10	367 -----DTKPSPQPEGKKPSVPDINQEKEKAKLAVAT	397	
HU7F-	PspC6	-----		
HU9V-	PspC3	-----		
HU14-	PspC3	-----		
HU18C-	PspC6	-----		
HU19A-	PspC5	536 ELSDKIDELDAEIAKLEVQLKDAEGNNNVEAYFKEGLEKTTAEKKAEELEKAEADLKKAVDE-----	596	
HU19F-	PspC9	141 -----DTKPSPQPEGKKPSVPDINQEKEKAKLAVVT	171	
HU23F-	PspC3	-----		
D39-	PspC3	-----		
HU1-	PspC6	-----		
HU3-	PspC8	-----		
HU4-	PspC3	-----		
HU5-	PspC3	-----		
HU6A-	PspC3	-----		
HU6B-	PspC4	514 YMSKILDDIKKHHLRKEKHHQIVALIKDLDKLKKQALSEIDNVNTKVEIENTVHKVFAMDTVVTKFQKGLIQNTPOV--	591	
HU6B-	PspC10	398 YMSKILDDIQKHHLQKEKHRQIVALIKELDELKKQALSEIDNVNTKVEIENTVHKIFADMDAVVTFFKKGLTQDTPKEPG	477	
HU7F-	PspC6	-----		
HU9V-	PspC3	-----		
HU14-	PspC3	-----		
HU18C-	PspC6	-----		
HU19A-	PspC5	-----		
HU19F-	PspC9	172 YMSKILDDIQKHHLQKEKHRQIVALIKELDELKKQALSEIDNVNTKVEIENTVHKIFADMDAVATKFKKGLTQDTPKEPG	251	
HU23F-	PspC3	-----		
D39-	PspC3	-----		
HU1-	PspC6	-----		
HU3-	PspC8	-----		
HU4-	PspC3	-----		
HU5-	PspC3	-----		
HU6A-	PspC3	-----		
HU6B-	PspC4	-----		
HU6B-	PspC10	478 NKKPSAPKPGMQPSPQ	493	
HU7F-	PspC6	-----		
HU9V-	PspC3	-----		
HU14-	PspC3	-----		
HU18C-	PspC6	-----		
HU19A-	PspC5	-----		
HU19F-	PspC9	252 NKKPSA-----	257	
HU23F-	PspC3	-----		

As sequência de PspC foram alinhadas utilizando o programa de alinhamento de múltiplas sequências COBALT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>). Os aminoácidos idênticos à sequência consenso (ALNIKLSAIKTK) de ligação do FH da bactéria D39 estão indicados em verde e as posições dos aminoácidos conservados estão destacados em azul claro (posição 2 (leucina), 6 (leucina), 9 (isoleucina) e 10 (lisina)). O motivo hexapeptídico da ligação de slgA Y(R ou H ou F ou L)RNYPT é mostrado em vermelho e os aminoácidos críticos YPT para a ligação de slgA estão destacados em amarelo.

APÊNDICE B - Sequência utilizada como molde para amplificação do gene *pspC3ΔFH*

```

1 atgcatgacagagaaacgagagaactacccaagtaccacttct
  M H A T E N E R T T Q V P T S
46 tctaataagggaagccagaacgtaggaaagctgctgaacaattc
  S N R G K P E R R K A A E Q F
91 gatgaatatataaacaataatgatccaattagataaaaagaaaacat
  D E Y I N K M I Q L D K R K H
136 aacccaaaatttagccttcaacataaagttgagcagaattaaaacg
  T Q N L A F N I K L S R I K T
181 gagtatttgaatggattaaaagagaagtcggaagctgagttgccg
  E Y L N G L K E K S E A E L P
226 tcaaaaataaaagcagagtttagacgcagcttttaagcagtttaaa
  S K I K A E L D A A F K Q F K
271 aaagatacattaccaacagaaccagaaaaaaagtagcagaagct
  K D T L P T E P E K K V A E A
316 cagaagaaggttgaagaagctgagaaaaaagccaaggtcaaaaa
  Q K K V E E A E K K A K A Q K
361 gaagaagatcgccgtaactaccaaccaatacttacaaaacgctt
  E E D R R N Y P T N T Y K T L
406 gaacttgaaattgctgagttcgatgtggaagttaaaaaagcggag
  E L E I A E F D V E V K K A E
451 cttgaactagtaaaagaggaagctaagaaacctttaacgagggc
  L E L V K E E A K K P L N E G
496 acaattaagcaagcaaaagagaaagttgagagtaaaaaagctgag
  T I K Q A K E K V E S K K A E
541 gctacaagggttagaaaaacatcaagacagatcgtaaaaaagcagaa
  A T R L E N I K T D R K K A E
586 gaagaagctaaacgaaaaagcagatgctaaagagcaagatgaatca
  E E A K R K A D A K E Q D E S
631 aagaggcggacaaaaacgagcagttcctggagagctagcaaacct
  K R R T K R A V P G E L A T P
676 gataaaaaagaaaatgatgcggagtcttcagattctagcgtaggt
  D K K E N D A E S S D S S V G
721 gaagaactcttccaagcccatccctgaaatcaggaaaaaaggtg
  E E T L P S P S L K S G K K V
766 gcagaagctgagaagaaggttgaagaagctgagaaaaaagccaag
  A E A E K K V E E A E K K A K
811 gctcaaaaagaagaagatcgccgtaactacccttccaatacttac
  A Q K E E D R R N Y P S N T Y
856 ttttcgcttgaacttgaaatttctgagtcgatgtggaagttaa
  F S L E L E I S E S D V E V K
901 aaagcggagtttgaactagtaaaagaggaggttaaggaacctcga
  K A E F E L V K E E A K E P R
946 aacgaggaaaaagtttaagcaagcaaaagcgaagttgagagttaa
  N E E K V K Q A K A K V E S K
991 aaagctgtggctacaaggttagaaaacatcaagacagatcgtaaa
  K A V A T R L E N I K T D R K
1036 aaagcagaagaagaagctaaacgaaaagcagcagaagaagataaa
  K A E E E A K R K A A E E D K
1081 gttaaagaaaaaacagctgaacaaccacaaccagcgccggctcct
  V K E K P A E Q P Q P A P A P
1126 caaccagaaaaaaccaactgaagagcctgagaatccagctccagct
  Q P E K P T E E P E N P A P A
1171 ccaaaaccagagaagccaagtgaacaaccacaa 1203
  P K P E K P A E Q P Q

```

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar fragmento 1 estão mostrados em azul e verde. Em vermelho, observa-se a região de ligação a FH. Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar o fragmento 2 estão mostrados em amarelo e roxo.

APÊNDICE C – Artigos publicados durante o doutorado (2010 a 2013).

Ferreira DM, Neill DR, Bangert M, Gritzfeld JF, Green N, Wright AK, Pennington SH, Moreno LB, **Moreno AT**, Miyaji EN, Wright AD, Collins AM, Goldblatt D, Kadioglu A, Gordon SB. Controlled Human Infection and Rechallenge with *Streptococcus pneumoniae* Reveals the Protective Efficacy of Carriage in Healthy Adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;15;187(8):855-64.

Vadesilho CF, Ferreira DM, **Moreno AT**, Chavez-Olortegui C, Machado de Avila RA, Oliveira ML, Ho PL, Miyaji EN. Characterization of the antibody response elicited by immunization with pneumococcal surface protein A (PspA) as recombinant protein or DNA vaccine and analysis of protection against an intranasal lethal challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog*. 2012;53(5-6):243-9.

Lima FA, Ferreira DM, **Moreno AT**, Ferreira PC, Palma GM, Ferreira JM Jr, Raw I, Miyaji EN, Ho PL, Oliveira ML. Controlled inflammatory responses in lungs is 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.

Moreno AT, Oliveira ML, Ho PL, Vadesilho CF, Palma GM, Ferreira JM Jr, Ferreira DM, Santos SR, Martinez MB, Miyaji EN. Cross-reactivity of anti-pneumococcal surface protein C (PspC) antibodies with different strains and evaluation of inhibition of human complement factor H and secretory IgA binding via PspC. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(4):499-507. **(Apêndice D)**.

Oliveira ML, Miyaji EN, Ferreira DM, **Moreno AT**, Ferreira PC, Lima FA, Santos FL, Sakauchi MA, Takata CS, Higashi HG, Raw I, Kubrusly FS, Ho PL. Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. *PLoS One*. 2010;27;5(5):e10863.

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

APÊNDICE D - Cross-reactivity of anti-pneumococcal surface protein C (PspC) antibodies with different strains and evaluation of inhibition of human complement factor H and secretory IgA binding via PspC