CINTIA FIUZA MARQUES VADESILHO

**Mapeamento de Epitopos Presentes em Variantes dos
Antígenos Vacinais PspA (*Pneumococcal surface protein A*)
e PspC (*Pneumococcal surface protein C*) de *Streptococcus
pneumoniae***

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

São Paulo
2014

CINTIA FIUZA MARQUES VADESILHO

**Mapeamento de Epitopos Presentes em Variantes dos
Antígenos Vacinais PspA (*Pneumococcal surface protein A*)
e PspC (*Pneumococcal surface protein C*) de *Streptococcus
pneumoniae***

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Dra. Eliane Namie Miyaji

Versão original

São Paulo
2014

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

© reprodução total

Vadesilho, Cintia Fiuza Marques.

Mapeamento de epitopos presentes em variantes dos antígenos vacinais PspA (Pneumococcal surface protein A) e PspC (Pneumococcal surface protein C) de *Streptococcus pneumoniae* / Cintia Fiuza Marques Vadesilho. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Eliane Namie Miyaji.

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

Versão do título para o inglês: Epitope mapping of *Streptococcus pneumoniae* vaccine antigens PspA (Pneumococcal surface protein A) and PspC (Pneumococcal surface protein C).

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Vacina 3. PspA 4. PspC
5. Mapeamento de epitopos 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/SBIB06/2014

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

Candidato(a): Cintia Fiuza Marques Vadesilho.

Título da Mapeamento de epitopos presentes em variantes dos
antígenos vacinais PspA (Pneumococcal surface protein A)
e PspC (Pneumococcal surface protein C) de *Streptococcus*
pneumoniae.

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

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. 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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Mapeamento de epitopos presentes em variantes dos antígenos vacinais PspA ("Pneumococcal surface protein A") e PspC ("Pneumococcal surface protein C) de *Streptococcus pneumoniae*", **protocolo nº 1012/13**, sob a responsabilidade de Eliana Namie Miyaji e Cintia Fiuza Marques Vadesilho - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 8/5/2013.

Vigência do Projeto: 06/2013 - 05/2016	Nº de animais/espécie
Laboratório de Biotecnologia Molecular I	246 camundongos Balb/c 18-22g (F); 36 camundongos C57Bl/6 18-22g (F)

São Paulo, 10 de maio de 2013

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

“Dedico este trabalho à minha filha, Manuela, que ainda dentro da barriga fez aflorar em mim o amor puro, incondicional, e me deu ainda mais energia para a conclusão desta importante etapa de minha vida.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Eliane Namie Miyaji, por esses seis anos de confiança, desde a Iniciação Científica até a finalização deste trabalho. Obrigada por dividir comigo todo o seu conhecimento, pela dedicação sempre que precisei, pela paciência e por me mostrar sempre o melhor caminho. Tenho certeza que antes de uma orientadora, tive uma amiga com a qual sempre poderei contar.

Ao Dr. Paulo Lee Ho, pela oportunidade da realização deste trabalho em seu laboratório e pelas sempre valiosas ponderações a respeito dos meus resultados. Suas críticas sempre foram muito construtivas e certamente fizeram de mim uma pessoa mais preparada para o mundo acadêmico.

À Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira, pela ajuda sempre que precisei, pelos conselhos experimentais, por sempre estar disposta a contribuir com algo positivo para o sucesso do grupo e por ter sido uma amiga durante todo esse tempo.

À Dra. Daniela Mulari Ferreira, que foi alguém essencial desde o início, tendo toda a paciência do mundo com a aluna de Iniciação que ficava colada nela o dia inteiro para aprender. Com você aprendi muito do que sei hoje e serei eternamente grata por isso. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com você também em Liverpool e por me acolher diversas vezes na sua casa. Você e o Bassim foram essenciais para eu suportar todo o tempo longe da família! Agradeço a vocês pela amizade e pela dedicação a mim os dois meses que passei aí!

À Dra. Adriana Tonet Moreno, que foi uma amiga verdadeira e indispensável todo esse tempo. Juntas nós rimos, lamentamos e vivemos aventuras! Obrigada pela disponibilidade de sempre e por me ouvir e aconselhar da melhor maneira possível. Sua amizade e ajuda foram essenciais para eu chegar até aqui! Obrigada!

Às amigas e companheiras de boas conversas e risadas: Luciane Schons, Liliane Fernandes e Claudia Sossai, que tornaram o ambiente de trabalho muito mais leve e

descontraído. Obrigada meninas pela energia de vocês, pelo convívio e conselhos de sempre!

Aos meus colegas de laboratório: Dr. Enéas de Carvalho, Dra. Josefa da Silva, Dr. Henrique Ramos, Dra. Regiane Fávaro, Dra. Patrícia Ferreira, Dra. Swiany Lima, Dra. Juliana Novo, Dra. Ana Tung, Dra. Carolina Mancini, MSc. Agtha Chaves, MSc. Fernanda Lima, MSc. Carolina Rivillas, Marília Hernani, Giovana Palma, Vanessa Moreira e Rubia Mancuso. Meu obrigada por qualquer ajuda e conversas oportunas!

Aos funcionários do laboratório, Aline Cavalher, Nídia de Moraes, Izilda Ramos e Leonardo Kobashi pela parceria e amizade e por tornarem nosso ambiente de trabalho um lugar melhor e mais organizado! Sem vocês nenhum aluno conseguiria desenvolver seu trabalho com mérito! Obrigada!

Ao nosso colaborador, Dr. David Briles, da Universidade do Alabama (USA), que teve uma contribuição muito positiva para o sucesso deste trabalho, pelas ideias e discussões sobre os resultados e pelo compartilhamento de material.

Ao nosso colaborador, Dr. Stephen Gordon, da Escola de Medicina Tropical de Liverpool (UK), que me proporcionou a oportunidade de estar em seu laboratório desenvolvendo parte deste trabalho, fazendo aumentar meu censo crítico e contribuindo sempre com bons questionamentos a respeito do trabalho.

Ao Dr. Jorge Ferreira, que sempre com muito carinho e disposição esteve pronto para a realização dos meus experimentos de citometria de fluxo, compartilhando sempre conversas muito agradáveis.

Aos meus pais, Luis e Vera, por serem meu alicerce. Agradeço a Deus por ter vocês! Obrigada por me apoiarem, sempre, em qualquer decisão na minha vida! Obrigada pelo amor incondicional, pelas palavras duras quando precisei, pelo carinho e atenção quando estava frágil, pela educação que tenho hoje, pela pessoa

decidida e determinada que me tornei e, principalmente, por estarem sempre ao meu lado! Obrigada por me trazerem até aqui! Obrigada por tudo! Amo muito vocês!

À minha irmã, Livia, que como caçulinha eu quis proteger, mas que se tornou uma mulher linda e forte, capaz de me trazer muitos ensinamentos. Obrigada minha malinha por ser essa irmã presente, mesmo morando longe. Obrigada pelo apoio e força de sempre! Te amo!

Ao meu marido e amigo de todas as horas, Marcelo. Meu presente de Deus! Sem você eu realmente não seria quem sou hoje. Obrigada por esses 12 anos de companheirismo, amor e dedicação! Obrigada por apoiar sempre minhas decisões, por não abrir mão da minha felicidade e por estar ao meu lado quando as coisas não dão muito certo. Com sua ajuda superei muitos obstáculos e cheguei até aqui. Obrigada por ser esse homem maravilhoso e por me dar meu maior presente, nossa filhotinha que está crescendo linda na minha barriga! Amo você incondicionalmente!

Aos meus sogros, Marta e Jorge, pela amizade e dedicação de 12 anos e por terem educado esse filho maravilhoso e terem feito dele um homem do bem! Amo vocês!

Aos meus cunhados, Monique, Eduardo, Marcus e Beatriz, que são antes de tudo meus grandes amigos. Obrigada pela dedicação, amor e apoio de sempre! Amo vocês!

Às minhas sobrinhas e filhas do coração, Luisa e Catarina, que foram as primeiras pessoinhas a me mostrar o real significado do amor puro. Obrigada por fazerem de mim uma pessoa melhor e mais equilibrada! Amo vocês!

Aos meus tios, que são muito presentes na minha vida e que sempre me ajudaram e apoiaram quando precisei! Amo muito essa minha família!

À FAPESP, ao CNPq, à Fundação Butantan e ao Medical Research Council (MRC) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito, não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser, mas graças a Deus não somos o que éramos (Martin Luther King).”

RESUMO

Vadesilho CFM. Mapeamento de Epitopos Presentes em Variantes dos Antígenos Vacinais PspA (*Pneumococcal surface protein A*) e PspC (*Pneumococcal surface protein C*) de *Streptococcus pneumoniae*. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Streptococcus pneumoniae faz parte da microbiota da nasofaringe de humanos e pode causar infecções do trato respiratório. Uma alternativa às vacinas conjugadas, que conferem proteção sorotipo-específica, seria uma vacina baseada em epitopos imunogênicos presentes nas diferentes variantes de antígenos como PspA e PspC. O objetivo deste trabalho foi a identificação de epitopos de diferentes variantes de PspA e PspC, utilizando a técnica *peptide array*, visando a síntese de um antígeno composto por múltiplos epitopos. Os resultados indicaram que anticorpos do soro de animais imunizados com variantes de PspA foram capazes de reconhecer peptídeos localizados na região inicial N-terminal das moléculas de PspA e os imunizados com o PspC3, nas regiões de ligação de Fator H (FH) e sIgA no PspC. Entretanto, essa região inicial N-terminal de PspA não se mostrou protetora em camundongos imunizados com uma proteína recombinante expressando três repetições dessa região, e os anticorpos do soro desses animais não foram capazes de se ligar à superfície do pneumococo intacto por citometria de fluxo. Para avaliação da real importância dessa região, anticorpos monoclonais (MAbs) foram utilizados em ensaios com os *peptide arrays* e os MAbs produzidos contra o PspA da cepa Rx1 não reconheceram qualquer peptídeo linear. A hipótese seria que esses MAbs reconheceriam então epitopos conformacionais. Assim, foram purificados sete fragmentos (Fragments) de 100 aminoácidos do PspARx1 e esses MAbs foram testados quanto à capacidade de reconhecimento desses Fragments por *immunoblotting* e ELISA. Apenas os Fragments 2 e 4 foram reconhecidos. Os Fragments também foram utilizados para imunização de camundongos e o soro obtido foi utilizado em ensaios de citometria de fluxo. Os anticorpos anti-Fragments foram capazes de se ligar à superfície do pneumococo, com exceção dos anti-Fragments 3, 6 e 7. Em concordância com esses resultados, animais imunizados com os Fragments 1, 2, 4 e 5 apresentaram proteção após desafio com a cepa A66.1. Seros de voluntários e pacientes humanos também foram avaliados nos *peptide arrays* e foi observado reconhecimento de peptídeos principalmente nas regiões inicial N-terminal e de prolinas. No caso do PspC3, o soro de alguns voluntários reconheceu peptídeos contendo a região de interação com sIgA. Os soros humanos foram testados também por ELISA quanto ao reconhecimento dos Fragments e os resultados indicaram que o Fragment2 pode ter importância na proteção contra colonização. Este trabalho mostra que anticorpos contra epitopos lineares de PspA reconhecem as regiões inicial N-terminal e rica em prolinas, mas estes epitopos parecem ser apenas marcadores de exposição ao pneumococo e os epitopos conformacionais seriam os de fato protetores, especialmente aqueles presentes nos Fragments 2 e 4. Epitopos lineares de PspC parecem ser importantes na região de ligação à sIgA e FH. Assim, uma vacina proteica de ampla cobertura, poderia conter as regiões do Fragment2 de PspA e de ligação de sIgA e FH de PspC.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Vacina. PspA. PspC. Epitopos.

ABSTRACT

Vadesilho CFM. Epitope Mapping of *Streptococcus pneumoniae* Vaccine Antigens PspA (*Pneumococcal surface protein A*) and PspC (*Pneumococcal surface protein C*). [dissertation (Master's dissertation [Biotechnology]). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Streptococcus pneumoniae is part of the microbiota of the human nasopharynx and it can cause respiratory tract infections. An alternative to the conjugate vaccines, which confer serotype-specific protection, would be a vaccine based on immunogenic epitopes of different variants of antigens such as PspA and PspC. The objective of this study was to identify epitopes of different variants of PspA and PspC, using the peptide array technique, aiming at the synthesis of a multi-epitope antigen. The results indicated that serum antibodies from animals immunized with PspA variants recognized peptides located in the initial N-terminal region of PspA molecules, whereas antibodies from animals immunized with PspC3 recognized peptides in the regions responsible for binding to factor H (FH) and sIgA in PspC. However, this initial N-terminal region of PspA elicited no protection in mice immunized with a recombinant protein expressing three repetitions of this region, and serum antibodies from these animals did not bind to the surface of intact pneumococci in flow cytometry analysis. To evaluate the real importance of this region, monoclonal antibodies (MAbs) were used with the peptide arrays and MAbs produced against PspA of strain Rx1 did not recognize any linear peptide. The hypothesis is that these MAbs recognize conformational epitopes. Thus, seven fragments (Fragments) containing 100 aminoacids of the PspARx1 were purified and these MAbs were tested for their ability to recognize these Fragments by immunoblotting and ELISA. Only Fragments 2 and 4 were recognized. Fragments were also used to immunize mice and the obtained sera were used in flow cytometric assays. Anti-Fragments sera were able to bind to the pneumococcal surface, with the exception of anti-Fragments 3, 6 and 7. In agreement with this result, animals immunized with Fragments 1, 2, 4 and 5 were protected against challenge with pneumococcal strain A66.1. Sera from human volunteers and patients were also evaluated using peptide arrays and recognition of peptides mainly in the initial N-terminal and proline-rich regions was observed. In the case of PspC3, the sera of some volunteers recognized peptides containing the region of interaction with sIgA. Human sera were also tested by ELISA for recognition of Fragments and the results indicated that the Fragment2 may be important in protection against colonization. This work shows that antibodies against linear epitopes of PspA recognize the initial N-terminal and proline-rich regions, but these epitopes seem to be only markers of exposure to pneumococcus and conformational epitopes would be in fact protective, especially those present in Fragments 2 and 4. Linear epitopes of PspC seem to be important in the regions of sIgA and FH binding. Thus, a protein-based vaccine with broad coverage could contain the regions of Fragment 2 of PspA and the regions of sIgA and FH binding of PspC.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Vaccine. PspA. PspC. Epitopes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Causas de morte no grupo de crianças menores de 5 anos de idade de países de baixa renda.....	26
Figura 2: Taxa de incidência e mortalidade causada por doenças pneumocócicas.....	27
Figura 3: Introdução da vacina pneumocócica e cobertura vacinal em crianças.....	34
Figura 4: Representação esquemática do pneumococo.....	35
Figura 5: Representação esquemática dos domínios contidos nas proteínas PspA e PspC dos clados A e B.....	37
Figura 6: Representação esquemática dos grupos da proteína PspC de acordo com a classificação de Iannelli e colaboradores.....	38
Figura 7: Modelo estrutural de PspC e seus receptores.....	40
Figura 8: Esquema de imunização subcutânea de camundongos.....	51
Figura 9: Figura ilustrativa do produto CelluSpots™ comercializado pela Intavis.....	55
Figura 10: Esquema ilustrativo simplificado do processo de síntese dos peptídeos em membrana de celulose.....	55
Figura 11: Análise da expressão dos PspAs e PspC3 em <i>E. coli</i> BL21 (Si).....	59
Figura 12: Análise por SDS-PAGE 10% dos PspAs purificados e dialisados.....	60
Figura 13: Ensaios de imunodeteção realizados com o primeiro grupo e segundo grupo de <i>peptide arrays</i> , incubados somente com anticorpo comercial anti-IgG de camundongo conjugado à fofatase alcalina.....	62
Figura 14: Ensaios de imunodeteção realizados com soro dos animais injetados apenas com Alum ou PspAs+Alum.....	63
Figura 15: Ensaios de imunodeteção realizados com soro dos animais imunizados com PspA2+Alum ou PspC3+Alum.....	71
Figura 16: Esquema ilustrativo da localização nas sequências dos PspAs dos peptídeos reconhecidos por todos os soros de camundongo nos ensaios de imunodeteção.....	73
Figura 17: Ilustração do gene sintético <i>pspAN-terminal</i>	74
Figura 18: Análise da digestão do plasmídeo pAE- <i>pspAN-terminal</i> com as enzimas <i>XhoI</i> e <i>EcoRI</i>	75

Figura 19: Análise da expressão do PspAN-terminal em <i>E. coli</i> BL21 Star pLys.....	75
Figura 20: Análise por SDS-PAGE 15% do PspAN-terminal purificado e dialisado.....	76
Figura 21: Ensaio de imunodeteção realizado com soro dos animais imunizados com PspAN-terminal+Alum.....	77
Figura 22: Análise da reatividade cruzada dos anticorpos anti-PspAN-terminal contra os PspAs dos clados 1 a 5.....	79
Figura 23: Ensaio de ligação dos anticorpos anti-PspAN-terminal às cepas ATCC6303 e 3JYP2670.....	80
Figura 24: Ensaio de imunodeteção realizado com os MAbs produzidos contra o PspA da cepa Rx1, utilizando o segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	81
Figura 25: Ensaios de imunodeteção realizados com os MAbs produzidos contra a região rica em prolinas do PspA1 da cepa AC094, utilizando o primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	82
Figura 26: Figura ilustrativa do PspARx1 e seus fragmentos.....	84
Figura 27: Análise da digestão dos plasmídeos pAE- <i>pspARx1</i> e pAE- <i>frags</i> com as enzimas <i>XhoI</i> e <i>EcoRI</i>	85
Figura 28: Análise da expressão do PspARx1 e dos Frags em <i>E. coli</i> BL21 (Si).....	86
Figura 29: Análise por SDS-PAGE do PspARx1 e dos Frags purificados e dialisados.....	88
Figura 30: Ensaio de ligação dos anticorpos anti-PspARx1 e anti-Frags à cepa D39.....	90
Figura 31: Análise por <i>immunoblotting</i> do reconhecimento dos Frags e do PspARx1 pelos diferentes MAbs.....	91
Figura 32: Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags pelos MAbs.....	93
Figura 33: Ensaios de imunodeteção realizados com o primeiro e segundo grupo de <i>peptide arrays</i> incubados somente com anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina.....	95
Figura 34: Ensaio de imunodeteção realizado com os soros dos voluntários do coorte A.....	96

Figura 35: Ensaio de imunodeteção realizado com os soros dos voluntários do coorte B com o segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	102
Figura 36: Ensaio de imunodeteção realizado com os soros dos voluntários do coorte B com o primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	106
Figura 37: Ensaio de imunodeteção realizado com os soros dos pacientes com doença do trato respiratório inferior, utilizando o primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	115
Figura 38: Ensaio de imunodeteção realizado com os soros dos pacientes controle com o primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	124
Figura 39: Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags do PspARx1 pelos soros dos voluntários do coorte A.....	131
Figura 40: Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags do PspARx1 pelos soros dos voluntários do coorte B recolonizados após redesafio.....	132
Figura 41: Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags do PspARx1 pelos soros dos voluntários do coorte B não recolonizados após redesafio.....	133
Figura 42: Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags do PspARx1 pelos soros dos voluntários dos coortes A e B e dos pacientes hospitalizados com doença do trato respiratório inferior.....	134
Figura 43: Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags do PspARx1 pelos soros dos adultos e idosos saudáveis.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nas clonagens do <i>psp2Rx1</i> e de seus fragmentos.....	48
Tabela 2: Massa molecular e o valor de pI preditos dos PspAs e PspC3.....	58
Tabela 3: Concentração de IgG anti-PspA ou anti-PspC obtida após imunização de camundongos BALB/c com as proteínas PspA1, PspA2, PspA3, PspA4, PspA4Pro, PspA5 e PspC3.....	61
Tabela 4: Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA1+Alum no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	65
Tabela 5: Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA2+Alum no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	66
Tabela 6: Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA3+Alum no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	67
Tabela 7: Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA4+Alum no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	68
Tabela 8: Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA4Pro+Alum no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	69
Tabela 9: Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA5+Alum no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	70
Tabela 10: Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA2+Alum no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	71
Tabela 11: Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspC3+Alum no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	72
Tabela 12: Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspAN-terminal+Alum no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	78
Tabela 13: Lista de MAbs produzidos contra o PspA da cepa Rx1 cedidos pelo Dr. David E. Briles.....	81
Tabela 14: Peptídeos reconhecidos pelos MAbs produzidos contra a região rica em prolinas do PspA1 da cepa AC094.....	83
Tabela 15: Massa molecular e o valor de pI preditos do PspARx1 e dos Frags.....	88

Tabela 16: Concentração de IgG anti-PspA obtida após imunização de camundongos BALB/c com as proteínas PspARx1, Frag1, Frag2, Frag3, Frag4, Frag5, Frag6 e Frag7.....	89
Tabela 17: Sobrevivência de camundongos BALB/c imunizados com as proteínas PspARx1, Frag1, Frag2, Frag3, Frag4, Frag5, Frag6 ou Frag7 após desafio intranasal letal com a cepa A66.1.....	94
Tabela 18: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 122/108 em T0 e T2 no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	98
Tabela 19: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 177/137 em T0 e T2 no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	99
Tabela 20: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 188/04 em T0 e T2 no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	100
Tabela 21: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 193/08 em T0 no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	101
Tabela 22: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 193/08 em T2 no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	101
Tabela 23: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 237/53 em T0 e T2 no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	103
Tabela 24: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 255/67 em T0 e T2 no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	104
Tabela 25: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 323/134 em T0 e T2 no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>	105
Tabela 26: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 208/23 em T0 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	108
Tabela 27: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 237/53 em T0 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	108
Tabela 28: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 238/54 em T0 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	109
Tabela 29: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 255/67 em T0 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	110
Tabela 30: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 292/105 em T0 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	111

Tabela 31: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 294/107 em T0 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	112
Tabela 32: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 323/134 em T0 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	112
Tabela 33: Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 347/158 em T0 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	114
Tabela 34: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 9386 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	117
Tabela 35: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10003 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	118
Tabela 36: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10004 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	119
Tabela 37: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10008 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	120
Tabela 38: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10011 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	120
Tabela 39: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10012 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	121
Tabela 40: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10018 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	121
Tabela 41: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10019 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	122
Tabela 42: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10023 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	123
Tabela 43: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10002 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	125
Tabela 44: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10006 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	126
Tabela 45: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10010 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	127
Tabela 46: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10013 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	128

Tabela 47: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10014 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	128
Tabela 48: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10016 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	129
Tabela 49: Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10020 no primeiro grupo de <i>peptide arrays</i>	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Alum - Hidróxido de Alumínio

Amp - Ampicilina

BSA - *Bovine Serum Albumin*

CBS - *Citrate Buffered Saline*

CDR - *Clade Defining Region*

CRM₁₉₇ - Toxina Diftérica Mutada, sem atividade tóxica

DO - Densidade Óptica

ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

FBS - *Fetal Bovine Serum*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

Frag - Fragmento

H₂O₂ - Água Oxigenada

His - Histidina

Ig - Imunoglobulina

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

in - intranasal

ip - intraperitoneal

kDa - KiloDalton

LPS - Lipopolissacarídeo

M - Molar

mM - Milimolar

m/V - massa/volume

µg - Micrograma

µL - Microlitro

nm - Nanômetro

OPD - Ortofenilenodiamina

pb - Pares de Bases

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PCV7 - *7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine*

PCV10 - *10-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine*

PCV13 - *13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine*

PS - Polissacarídeo Capsular

PspA - *Pneumococcal Surface Protein A*

pspA: Gene da *Pneumococcal Surface Protein A*

PspC - *Pneumococcal Surface Protein C*

pspC - Gene da *Pneumococcal Surface Protein C*

SDS-PAGE - *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

TBS - *Tris Buffered Saline*

THY - Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura

UFC - unidade formadora de colônia

V/V - volume/volume

X-Gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	25
1.2 Epidemiologia	25
1.3 Antibióticos e Vacinas	29
1.4 <i>Pneumococcal surface protein A</i>	35
1.5 <i>Pneumococcal surface protein C</i>	37
1.6 Mapeamento de Epitopos de Antígenos Vacinais	41
2 OBJETIVO GERAL	43
2.1 Delineamento experimental	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Lista de meios de cultura e soluções	45
3.2 Clonagem do <i>pspA</i> da cepa Rx1 e de seus fragmentos e síntese do gene <i>pspAN-terminal</i>	46
3.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes	48
3.4 Imunização de camundongos e produção dos soros anti-PspC3, anti-PspAs, anti-Frags e anti-PspAN-terminal	50
3.5 Coleta de soro de voluntários e pacientes humanos	51
3.6 Análise de indução de anticorpos por ELISA	53
3.7 Síntese dos peptídeos em suporte sólido	53
3.8 Ensaios de imunodeteção com os <i>peptide arrays</i>	56
3.9 <i>Immunoblotting</i>	56
3.10 Análise por citometria de fluxo da ligação de anticorpos IgG anti-frags e IgG anti-PspAN-terminal à superfície da bactéria	57
3.11 Desafio de sobrevivência de camundongos	57
4 RESULTADOS	58
4.1 Expressão e purificação dos PspAs e PspC3 recombinantes	58
4.2 Avaliação de anticorpos anti-PspAs e anti-PspC em camundongos	60
4.2.1 Análise por ELISA da indução de anticorpos anti-PspAs e anti-PspC3 em camundongos	60
4.2.2 Ensaios de imunodeteção com os soros anti-PspAs e anti-PspC3 de camundongos utilizando <i>peptide arrays</i>	61
4.3 PspAN-terminal	74
4.3.1 Gene <i>pspAN-terminal</i> e proteína recombinante <i>PspAN-terminal</i>	74

4.3.2 Análise por ELISA da indução de anticorpos anti-PspAN-terminal em camundongos.....	76
4.3.3 Ensaios de imunodeteção com o soro anti-PspAN-terminal utilizando peptide arrays.....	77
4.3.4 Análise por ELISA da reatividade cruzada dos anticorpos anti-PspAN-terminal.....	78
4.3.5 Ensaios funcionais de ligação de anticorpos anti-PspAN-terminal à superfície do pneumoco.....	79
4.3.6 Desafio de sobrevivência de camundongos imunizados com PspAN-terminal.....	80
4.4 Avaliação de anticorpos monoclonais em ensaios de imunodeteção utilizando peptide arrays.....	80
4.5 PspA da cepa Rx1 e seus fragmentos.....	83
4.5.1 Clonagem do pspA da cepa Rx1 e de seus fragmentos.....	83
4.5.2 Expressão e purificação do PspARx1 e dos seus fragmentos.....	85
4.5.3 Análise por ELISA da indução de anticorpos anti-PspARx1 e anti-Frags em camundongos.....	89
4.5.4 Ensaio funcional de ligação dos anticorpos anti-PspARx1 e anti-Frags à superfície do pneumococo.....	89
4.5.5 Avaliação por immunoblotting do reconhecimento dos fragmentos pelos MAbs.....	90
4.5.6 Análise por ELISA do reconhecimento dos fragmentos pelos MAbs.....	92
4.5.7 Desafio de sobrevivência de camundongos imunizados com PspARx1 e seus fragmentos.....	93
4.6 Avaliação de indução de anticorpos anti-PspA e anti-PspC em humanos..	94
4.6.1 Ensaios de imunodeteção com soros de voluntários humanos da Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM) utilizando peptide arrays.....	94
4.6.2 Ensaios de imunodeteção com soros de pacientes humanos hospitalizados da Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM) utilizando peptide arrays.....	114
4.6.3 Análise por ELISA do reconhecimento dos fragmentos do PspARx1 pelos soros dos voluntários e pacientes da Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM).....	130
5 DISCUSSÃO.....	136
REFERÊNCIAS.....	148
APÊNDICES.....	158
APÊNDICE A - Sequências dos peptídeos sintetizados no primeiro grupo de peptide arrays.....	158

APÊNDICE B - Sequências dos peptídeos sintetizados no segundo grupo de <i>peptide arrays</i>.....	166
APÊNDICE C - Sequências do PspARx1 e dos seus fragmentos.....	173
APÊNDICE D - Artigos publicados no período do mestrado (2012 a 2014).....	174

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae é um diplococo Gram-positivo, encapsulado, anaeróbico aerotolerante (crescimento uniforme e tolerância à presença de oxigênio), que faz parte da microbiota da nasofaringe e da orofaringe de indivíduos sadios, mas que pode se tornar um patógeno bacteriano causador de doenças com alta mortalidade e morbidade como meningite, sepse e pneumonia, além de ser a causa mais comum de otite média aguda. O pneumococo, como é comumente conhecido, tem sido um dos microrganismos mais estudados desde seu primeiro isolamento em 1881 (AlonsoDeVelasco et al., 1995).

A superfície do pneumococo é dividida em três estruturas: a membrana plasmática, a parede celular e a cápsula polissacarídica (PS). Esta última atua como o principal fator de virulência da bactéria, protegendo-a da fagocitose promovida pelo sistema imune (Kadioglu et al., 2008). Entretanto, esta estrutura é altamente variável e, de acordo com essas diferenças na composição e estrutura química da cápsula, já foram identificados mais de 90 sorotipos, que apresentam baixa reatividade cruzada entre si (Yother, 2004).

1.2 Epidemiologia

Há uma variação muito grande nos aspectos epidemiológicos da doença pneumocócica, que mudam de um país para o outro e ao longo do tempo. Com isso, existe uma necessidade de monitoramento constante dos sorotipos circulantes e do padrão de resistência antimicrobiana para uma melhor orientação terapêutica e direcionamento de estratégias de controle (Dagan et al., 1997; Hausdorff et al., 2000; Yoshioka et al., 2011).

Foi estimado que houve 14,5 milhões de episódios de doenças graves causadas por pneumococo no mundo em 2000, causando 826.000 mortes em crianças abaixo de 5 anos, das quais 91.000 eram HIV positivas. Dentre as HIV negativas, mais de 61% das mortes ocorreram em países africanos e asiáticos. Assim, infecções causadas por pneumococo seriam responsáveis por 11% de todas

as mortes nessa faixa etária (O'Brien et al., 2009). A pneumonia é a doença mais comum causada por pneumococo e é uma das principais causas de morte em crianças abaixo de 5 anos de idade em países de baixa renda (Figura 1) (GAVI Alliance). A Figura 2A mostra a taxa de incidência global de doenças pneumocócicas em crianças menores de 5 anos e a Figura 2B apresenta a taxa de mortalidade por pneumococo em crianças HIV negativas.

Figura 1 - Causas de morte no grupo de crianças menores de 5 anos de idade de países de baixa renda (Fonte: *Pneumococcal factsheet* – GAVI Alliance – <http://www.gavialliance.org/support/nvs/pneumococcal/>).

Figura 2 - Taxa de incidência e mortalidade causada por doenças pneumocócicas. (A) A incidência de doença causada por *Streptococcus pneumoniae* em todo o mundo, representada em casos por 100.000 crianças menores de 5 anos de idade (Ferreira et al., 2011). (B) Taxa de mortalidade causada por doenças pneumocócicas, representada em mortes por 100 mil crianças HIV negativas menores de 5 anos de idade (O'Brien et al., 2009).

Estimativas feitas com base em dados de 2005 mostraram que *S. pneumoniae* causaria mais de 40.000 mortes anuais no Brasil, com mais de 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). No período de 2000 a 2008, a média anual de meningite pneumocócica foi de 1.218 casos, o que representa aproximadamente 11% dos casos de meningite bacteriana registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e a letalidade média foi de 30%. Neste mesmo período ocorreram no país 7.129.291 de internações por pneumonias, sendo 45% destas em menores de cinco anos de idade, resultando em uma frequência média anual de 2.100 internações/100.000 habitantes (Ministério da Saúde - Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente no calendário básico de vacinação da criança). A pneumonia é, no Brasil, a principal razão de hospitalização de crianças (Ministério da saúde - Datasus). Além disso, com base em dados de 2003, foi estimado que 34.217 hospitalizações pelo Sistema Nacional de Saúde Brasileiro foram causadas por doença pneumocócica, contabilizando 0,1% de todas as hospitalizações no setor público (Novaes et al., 2011).

Até o momento foram descritos 93 sorotipos capsulares de pneumococo, incluindo o sorotipo 11E recentemente identificado (Calix, Nahm, 2010). A maioria das doenças pneumocócicas em crianças está associada a um número restrito de sorotipos, variando de acordo com a região geográfica considerada (Dagan, 2004). Alguns estudos 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).

Com o intuito de aumentar o entendimento sobre os sorotipos mais comuns circulantes em países da América Latina e sobre as causas que levam crianças menores de 6 anos a adquirir doenças pneumocócicas invasivas, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) estimulou a criação de um projeto que preenchesse essa lacuna. Assim, foi criado o projeto SIREVA (Sistema Regional de Vacinas), que é responsável pela vigilância epidemiológica do *S. pneumoniae* em

países latino americanos. Na América Latina, foram encontrados 13 sorotipos que correspondem a 85% dos isolados invasivos (Di Fabio et al., 2001; Laval et al., 2006). No Brasil, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) é a referência nacional do Sistema Regional de Vacinas (SIREVA-VIGIA), compondo a rede de laboratórios dos países da América Latina para a vigilância do *S. pneumoniae*. No período de 2000 a 2008, o IAL analisou 4.372 cepas de pneumococo, sendo 62% isoladas de pacientes com meningite, 28% de pacientes com pneumonia e 2% de pacientes com bacteremia. Os sorotipos mais frequentemente identificados foram: 14 (27,9%); 6B (9,7%); 19F (5,4%); 23F (5,4%); 18C (5,1%); 6A (4,3%); 1 (3,8%); 3 (4,5%); 5 (3,5%); 19A (3,3%); 9V (3,2%); 4 (2,8%); 7F (2,1%); e outros (19,1%) (Ministério da Saúde - Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente no calendário básico de vacinação da criança).

1.3 Antibióticos e Vacinas

Em um estudo realizado pelo SIREVA entre 2000 e 2005, com isolamento de 8.993 cepas de pneumococo, verificou-se que para pneumonia, sepse e bacteremia, 38,8% dos isolados mostraram resistência à penicilina (21,5% intermediária e 17,3% elevada) e, para meningite, a resistência foi de 30,5% (19,3% intermediária e 11,2% elevada) (Castaneda et al., 2009).

A penicilina tem sido substituída por antibióticos mais caros e de amplo espectro. Entretanto, estudos retrospectivos envolvendo adultos e crianças mostraram que os resultados do tratamento das pneumonias pneumocócicas causadas por cepas resistentes com penicilina não diferiam dos resultados obtidos com outros antimicrobianos, sugerindo que os pontos de corte utilizados para meningites não se aplicavam no caso de 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. Atualmente, para doenças não meníngeas, cepas isoladas com CIM ≤ 2 µg/mL (concentração inibitória mínima) são consideradas sensíveis; com CIM = 4 µg/mL, com resistência intermediária; e resistentes, com CIM ≥ 8 µg/mL. Cepas isoladas de meningites são consideradas sensíveis se CIM $\leq 0,06$ µg/mL e resistentes se CIM $\geq 0,12$ µg/mL (CDC, 2008).

Em um estudo realizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, 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 também verificou alta taxa de sensibilidade à vancomicina, rifampicina, ceftriaxona, clindamicina, cloranfenicol e eritromicina para as cepas testadas (Yoshioka et al., 2011). Recentemente, um estudo realizado em hospitais da cidade de Porto Alegre (RS) mostrou que, no período de 2010 a 2012, os sorotipos mais comuns encontrados em pacientes com doença pneumocócica invasiva foram: 14 (10%), 4 (9%), 3 (8%), 20 (7%), 7F (6%), 12F (6%), 23F (6%), 19A (4%), 9V (3%), 6B (3%) e 19F (3%). Desses isolados, o sorotipo 14 foi mais frequentemente isolado em crianças abaixo de cinco anos de idade. Todos os isolados apresentaram sensibilidade à penicilina e ceftriaxona, entretanto, uma resistência intermediária a esses antibióticos foi observada em três isolados, sendo todos pertencentes ao sorotipo 19A (Mott et al., 2013).

Embora não haja atualmente um problema sério de resistência de *S. pneumoniae* à penicilina, a vacinação continua sendo a estratégia ideal para o controle das doenças pneumocócicas, pois o controle da infecção com antibiótico muitas vezes não evita a ocorrência de sequelas, como as que podem ser causadas por meningite, por exemplo.

Atualmente, as quatro vacinas disponíveis no mercado baseiam-se 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 (Pneumovax – Merck) é composta por PS de 23 sorotipos (PPSV23) (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F) e é pouco imunogênica nos grupos mais suscetíveis (idosos e crianças). Essa baixa imunogenicidade deve estar associada ao fato de a resposta ser independente de células T e, portanto, não induzir memória imunológica. No Brasil, a vacina PPSV23

foi incorporada pelo Programa Nacional de Imunizações no ano de 1992, para grupos com quadros clínicos específicos.

As vacinas de segunda geração são as vacinas conjugadas a um carreador proteico. A primeira vacina de segunda geração é a 7-valente (PCV7) (Prevenar – Wyeth), composta por PS de 7 sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) conjugados à toxina diftérica destoxificada geneticamente (CRM₁₉₇), licenciada nos Estados Unidos em 2000. No Brasil, a PCV7 foi incorporada pelo Ministério da Saúde em 2001 em grupos com condições clínicas especiais nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais (CRIE). 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 PCV7 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, sendo capaz de promover uma “imunização em 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). Entretanto, após alguns anos, estudos sobre o impacto da implementação da PCV7 indicaram o aumento nos casos de infecções causadas por sorotipos ausentes na vacina, verificando-se, assim, a substituição dos sorotipos prevalentes, devido à pressão seletiva promovida pela vacina (Weinberger et al., 2011). Dados de 1998 a 2004 mostraram 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 publicados em 2007 mostraram que, após a implementação da PCV7, houve um aumento no número de doença invasiva e otite média causadas por sorotipos de pneumococos não vacinais (Hicks et al., 2007; Singleton et al., 2007).

Outro exemplo do problema da substituição de sorotipo ocorreu com o aumento do sorotipo 6C, que foi descrito em 2007 (Park et al., 2007). Um estudo

realizado em Hong Kong mostrou um aumento do sorotipo 6C após a introdução da PCV7. Esse resultado foi similar ao ocorrido após a introdução da PCV7 nos Estados Unidos (Nahm et al., 2009) e no Reino Unido (Tocheva et al., 2010). Nos Estados Unidos, o aumento na prevalência do sorotipo 6C foi notificado tanto em crianças hospitalizadas com doença pneumocócica, como em adultos com doença pneumocócica invasiva (Green et al., 2011).

Estes resultados indicam a necessidade da ampliação de cobertura de sorotipos nas formulações vacinais e, de fato, novas vacinas conjugadas contendo 10 e 13 sorotipos foram licenciadas em 2009 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 (PCV10) (GlaxoSmithKline Biologicals), que é constituída de três diferentes carreadores: proteína D de *Haemophilus influenzae* (conjugada individualmente ao polissacarídeo capsular dos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F), toxoide tetânico (conjugado ao sorotipo 18C) e toxoide diftérico (conjugado ao sorotipo 19F). Esta vacina foi introduzida no Programa Nacional de Imunizações no Brasil em Abril de 2010. No entanto, sua utilização representa um grande ônus ao sistema público de saúde brasileiro, devido ao alto custo. No ano de 2013 foram adquiridas pelo Ministério da Saúde 11 milhões de doses ao custo de R\$ 33,01 cada dose (comunicação pessoal – Carla Domingues, coordenadora do Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde). Existiam no Brasil, antes da introdução da vacina conjugada, 10 sorotipos mais prevalentes, sendo que 45% das doenças eram causadas pelos sorotipos 14, 6B e 1. O sorotipo 14 causava mais infecções em crianças, enquanto os sorotipos 3 e 4 eram mais comuns em adultos. Os sorotipos 1 e 6B eram prevalentes em todas as idades (Brandileone et al., 2003).

A terceira vacina de segunda geração é a vacina 13-valente (PCV13) (Pfizer), que foi licenciada em substituição à PCV7 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 et al., 2006) e no Brasil, aumentaria a cobertura para mais de 90% (Mantese et al., 2009; Yoshioka et al., 2011).

Nos Estados Unidos, após a substituição da PCV7 pela PCV13 no calendário

de imunização, no ano de 2010, foi observada uma redução de 42% nas doenças pneumocócicas invasivas só no primeiro ano de sua implementação, em comparação com a média dos casos que ocorreram entre 2007 a 2009. No grupo de crianças com menos de dois anos de idade, essa diminuição foi ainda maior, chegando a 53%. Além disso, foi observada uma redução de 57% no isolamento dos sorotipos vacinais neste mesmo período, sendo que os sorotipos 19A, 7F e 3 tiveram uma redução de 58%, 54% e 68%, respectivamente. Os sorotipos não contidos na PCV13, que foram mais encontrados em 2010 e 2011, foram: 33F, 22F, 12, 15B, 15C, 23A e 11 (Kaplan et al., 2013). Outros estudos mostraram que a eficácia da PCV13 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). No Brasil, um estudo recente (Dos Santos et al., 2013) mostrou que, após a implementação da PCV10, houve uma redução significativa na incidência de doença pneumocócica invasiva (de 20.3 para 3.97 casos/1000 pessoas) no grupo de crianças com menos de dois anos de idade. Além disso, foi mostrado que também houve uma redução de doenças pneumocócicas invasivas causadas pelos sorotipos vacinais. Antes da implementação da vacina, o sorotipo 14 era o mais prevalente em todos os grupos etários e, após a implementação da vacina, o sorotipo mais prevalente passou a ser o 7F.

A figura 3 ilustra os países que introduziram as vacinas conjugadas (Figura 3A) e a cobertura dessas vacinas em crianças (Figura 3B). 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 PCV7 mostraram claramente um aumento de doenças causadas por sorotipos não vacinais. Uma alternativa para as vacinas conjugadas seria uma vacina baseada em antígenos proteicos protetores presentes 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 de produção. PspA (*Pneumococcal surface protein A*) e PspC (*Pneumococcal surface protein C*), fatores de virulência envolvidos principalmente na infecção invasiva e na colonização, respectivamente,

estão entre os antígenos proteicos mais promissores para a composição de uma nova vacina (Figura 4) (Tai, 2006).

Figura 3 - Introdução da vacina pneumocócica e cobertura vacinal em crianças. (A) Introdução ou o planejamento de introdução da vacina pneumocócica conjugada em todo o mundo (B) Cobertura da vacina pneumocócica conjugada em 2010, após 3 doses de vacinação (Adaptado de WHO/Unicef *Joint Reporting Form on Immunization - PCV_CManTel_VisionGlobal_ARG_Mar2012.pdf*).

Figura 4 - Representação esquemática do pneumococo. Na parede celular do pneumococo podem ser vistos fatores de virulência pertencentes a diferentes classes. 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 de ligação à colina PspA, PspC (destacadas nas elipses de cor rosa) e LytA e as lipoproteínas PsaA, PiuA, PiaA, PpmA e SlrA podem ser vistas. Além disso, estão representadas as proteínas PavA, Enolase e GAPDH, assim como os componentes de parede celular TAs, LTAs e PCho e a proteína citosólica pneumolisina (Fonte: Adaptado de Gamez, Hammerschmidt, 2012).

1.4 *Pneumococcal surface protein A*

A proteína de superfície A de pneumococo (PspA) é um fator de virulência exposto, presente em todos os isolados descritos de *S. pneumoniae*, que apresenta variabilidade estrutural e antigênica (McDaniel et al., 1994). PspA interage entre o patógeno e o hospedeiro, interferindo na ativação e deposição de fatores do sistema complemento na superfície da bactéria, ligando-se principalmente à molécula C3 (Ren et al., 2004; Tu et al., 1999).

Já foi demonstrado que PspA recombinante, administrada com adjuvantes, pode induzir uma resposta de anticorpos 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 se ligar 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 está relacionado à sua capacidade de sequestrar Fe^{+2} das mucosas, tornando-o indisponível para a bactéria (Arnold et al., 1980).

PspA apresenta um domínio na região C-terminal de ligação à colina; ao lado desse domínio há uma região rica em prolinas e na região N-terminal há um domínio em α -hélice que fica exposto na parede bacteriana (Figura 5) (Yother, Briles, 1992). Com base na diversidade da sequência de aminoácidos da região variável localizada antes da região rica em prolinas, 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 bastante baixa, foi proposto que uma vacina baseada em PspA deveria conter ao menos um PspA pertencente à Família 1 e outro à Família 2, para apresentar uma maior cobertura. Ao analisar fragmentos de PspA de clados 1 a 5, nosso grupo observou que PspAs de clado 4 (PspA4) e de clado 5 (PspA5) foram capazes de induzir anticorpos que reconhecem a maioria dos isolados de pneumococo em experimentos de *immunoblotting* (Darrieux et al., 2008). Os anticorpos gerados contra PspA4 e PspA5 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 gene *pspC* é um gene parálogo de *pspA*, com domínios estruturais similares ao PspA, incluindo a região em α -hélice, seguida pela região rica em prolinas e a região de ligação à colina (Brooks-Walter et al., 1999) (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática dos domínios contidos nas proteínas PspA e PspC dos clados A e B (Fonte: Adaptado de Brooks-Walter et al, 1999).

Inicialmente, Brooks-Walter e colaboradores propuseram uma divisão de PspC em dois clados: o clado A, composto por proteínas maiores e possuindo uma região semelhante à PspA, e o clado B, composto por alelos menores, sem a região semelhante à PspA (Brooks-Walter et al., 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. 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 reunidos nos grupos 1 a 6, e aqueles cuja ligação é realizada através do motivo LPXTG foram reunidos nos grupos 7 a 11 (Figura 6). As proteínas com ancoramento via colina, através do *choline-binding domain* (CBD),

apresentam uma ligação não covalente à porção fosforilcolina (ácidos teicoicos da parede celular e ácidos lipoteicoicos da membrana plasmática) na superfície bacteriana (Yother, 2004). Em contraste, as proteínas PspC cujo ancoramento é via motivo LPXTG, são ligadas covalentemente ao peptidoglicano bacteriano através da reação de transpeptidação da sortase (Paterson, Mitchell, 2006).

Figura 6 - Representação esquemática dos grupos da proteína PspC de acordo com a classificação de Iannelli e colaboradores. Estão representados os 11 grupos de PspC, de acordo com a classificação de Iannelli e colaboradores. Os grupos proteicos estão separados em dois blocos, dependendo do tipo de ancoragem encontrada. Proteínas que têm a região de ligação à colina (azul escuro; grupos 1-6) estão representadas na parte superior e proteínas com a região de ligação do tipo LPXTG (azul claro; grupos 7-11) encontram-se na parte inferior. As sequências homólogas estão representadas nos blocos de mesma cor. A sequência sinal está representada em preto e os domínios de ancoragem em azul. As regiões ricas em prolina estão representadas pelos blocos verdes; 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. (Fonte: Adaptado de Iannelli et al., 2002).

Diferentes grupos descreveram PspC com diversos nomes e demonstraram diferentes funções para a proteína. PspC foi denominada CbpA (*choline-binding protein A* ou *C3-binding protein A*), apresentando adesão à células epiteliais e endoteliais humanas ativadas (Rosenow et al., 1997) e ligação ao componente C3 do complemento (Cheng et al., 2000). PspC também foi descrito como SpsA (*S. pneumoniae IgA binding protein*), devido à ligação dessa proteína ao componente secretório da imunoglobulina A humana (slgA) (Hammerschmidt et al., 1997) através de um motivo hexapeptídico conservado (YRNYPT) dentro da região de α -hélice de PspC (Figura 7) (Hammerschmidt et al., 2000). A ligação de PspC ao receptor polimérico de Imunoglobulina (plgR) parece promover a invasão e migração do pneumococo através do epitélio da nasofaringe (Balachandran et al., 2002; Zhang et al., 2000). 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. Foi descrito que a ligação com PspC ocorre através das regiões SCR (*short consensus repeats*) 8-11 e 19-20 do FH (Figura 7) (Hammerschmidt et al., 2007; Jarva et al., 2002) e que esta interação promove a adesão a células epiteliais e endoteliais (Hammerschmidt et al., 2007; Quin et al., 2007). A ligação do FH ocorre por meio de um motivo altamente conservado de 12 aminoácidos (ALNIKLSAIKTK), dentro da região N-terminal de 89 aminoácidos de PspC. PspC pode interagir ao mesmo tempo com FH e slgA, já que os domínios de ligação a cada um destes componentes é distinto (Dave et al., 2004). Foi demonstrado ainda que, além da participação de FH, a fixação do pneumococo às células epiteliais respiratórias é mediada por soro ou proteínas da matriz extracelular incluindo a trombospondina-1 e a vitronectina (Agarwal et al., 2010; Bergmann et al., 2009; Hammerschmidt et al., 2007; Rennemeier et al., 2007). De fato, Voss e colaboradores (Voss et al., 2013) mostraram que existe interação entre vitronectina e PspC. Essa interação parece ocorrer entre o domínio de ligação à heparina na região C-terminal da vitronectina, e as repetições 1 e 2 (R1 e R2) de PspC, que também estão envolvidos na interação com slgA. Ensaios utilizando slgA e vitronectina confirmaram a competição das duas moléculas pelos sítios em R1 e R2

em PspC. Este estudo reforça o importante papel que PspC exerce na aderência do pneumococo à célula hospedeira, protegendo a bactéria da atuação do sistema imune.

Figura 7 - Modelo estrutural de PspC e seus receptores: receptor polimérico Ig (plgR) e Fator H (FH). A proteína PspC interage, através de dois motivos hexapeptídeos N-terminais repetidos, R1 e R2, com os domínios D3 e D4 do plgR, que fazem parte do componente secretor livre (CS), IgA secretória (slgA). A liberação de CS livre, ou de CS ligado à IgA dimérica ocorre por clivagem proteolítica do plgR (clivagem de CS). Adicionalmente, PspC liga-se também ao FH. A proteína Hic, também conhecida como PspC, liga-se ao FH por um motivo de ligação localizado em sua região N-terminal. A região de ligação a FH de Hic possui homologia com a região N-terminal de PspC (Fonte: Adaptado de Gamez, Hammerschmidt, 2012).

A imunização nasal com PspC levou à proteção de camundongos contra desafio intranasal de colonização (Balachandran et al., 2002), enquanto que a imunização parenteral com PspC e 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., 2007). 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. Dados obtidos por nosso grupo, ao avaliar diferentes moléculas de PspC, mostraram ainda que a imunização com PspC do grupo 3 (PspC3) induz anticorpos com ampla reatividade cruzada, reconhecendo extratos de isolados expressando diferentes PspCs em experimentos de *immunoblotting* (Moreno et al., 2012).

Um estudo recente, que avaliou o genoma completo de 240 isolados de pneumococo, 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). Assim, foi proposto que esses antígenos são realmente importantes e estão envolvidos na evasão do sistema imune, mas que sua utilização como vacina poderia levar a um fenômeno semelhante àquele observado com a substituição de sorotipos através do uso da vacina conjugada polissacarídica 7-valente. Desse modo, a escolha de moléculas de PspA e PspC capazes de induzir anticorpos com ampla reatividade cruzada seria essencial. De forma alternativa, poderiam ser escolhidos apenas epítopos imunogênicos, presentes nas diferentes variantes de PspA e PspC.

1.6 Mapeamento de Epítopos de Antígenos Vacinais

Desde a introdução da síntese de peptídeos em superfícies sólidas, por Robert Bruce Merrifield em 1963, essa técnica tornou-se uma ferramenta importante em muitos campos da ciência. Diferentes processos de síntese foram desenvolvidos ao longo desses anos, como a técnica *pin synthesis*. Entretanto, a técnica que se mostrou mais eficaz foi a *spot synthesis*, por ser de fácil utilização em laboratório e de fácil manuseio. Essa técnica foi desenvolvida por Ronald Frank e colaboradores em 1990 (Hilpert et al., 2007). Atualmente, é possível a síntese de um grande número de peptídeos em membranas de celulose ou outros suportes sólidos, através da técnica *spot synthesis*, gerando *peptide arrays* (Frank, 2002). O uso da celulose, entretanto, possui uma série de vantagens em relação a outros materiais: é um material barato e resistente aos solventes orgânicos e ácidos utilizados durante a

síntese dos peptídeos; além disso, é estável em soluções aquosas e, portanto, não tóxica, sendo apropriada para *screening* com amostras biológicas.

Uma das utilizações dessa metodologia é identificar epitopos mais imunogênicos, avaliando-se a reatividade de anticorpos policlonais com uma biblioteca de peptídeos que cobre toda a sequência de um antígeno vacinal. A maioria dos trabalhos publicados utilizando *spot synthesis* está relacionada a esta aplicação (Hilpert et al., 2007). De fato, alguns antígenos vacinais já foram mapeados através da técnica *spot synthesis* com soros de indivíduos expostos ao patógeno para determinação das regiões mais imunogênicas (de Moura et al., 2011; Lima-Junior et al., 2011; Lottersberger et al., 2009).

Alguns trabalhos utilizaram a técnica para mapear epitopos de antígenos de *S. pneumoniae*. Werno e colaboradores (Werno et al., 2012) mapearam epitopos do antígeno *Pneumococcal Surface Adhesin A* (PsaA), utilizando anticorpos monoclonais e policlonais gerados contra a proteína recombinante (rPsaA), buscando uma aplicação para diagnóstico de doenças pneumocócicas invasivas.

Recentemente também foi realizado o mapeamento para ligação a MHC II de epitopos de PspA da cepa R6 (Singh et al., 2010). A predição *in silico* de ligação a 16 MHC II humanos e 4 MHC II de camundongos mostrou que quase todos os peptídeos poderiam potencialmente ligar-se a várias moléculas de MHC II humanas e de camundongos. Para a avaliação *in vivo* da ligação a MHC II dos peptídeos, células CD4⁺ T-auxiliadoras de camundongos desafiados por via nasal com *S. pneumoniae* foram avaliadas quanto à capacidade de proliferação e secreção de citocinas após estímulo *in vitro* com os diferentes peptídeos. Os peptídeos que induziram maior proliferação e secreção de citocinas estavam localizados próximo à região CDR (final da região N-terminal em α -hélice). Outros trabalhos, utilizando anticorpos monoclonais, também indicaram a presença de epitopos imunogênicos na região N-terminal do PspA da cepa Rx1 (Kolberg et al., 2003; McDaniel et al., 1994). É importante ressaltar que essas sequências são de uma molécula de PspA de clado 2 (Família 1), que não estão presentes em PspAs de Família 2 (clados 3, 4 e 5). Essa região, portanto, não é conservada e não está presente nas sequências de PspA4 e PspA5 testadas por nosso grupo e que induzem anticorpos com ampla reatividade cruzada.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi a identificação de epitopos de diferentes variantes de PspA e PspC, pela utilização da técnica *peptide array*, visando a síntese de um antígeno composto por múltiplos epitopos, com potencial de induzir anticorpos que apresentem ampla reatividade cruzada.

2.1 Delineamento experimental

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% (m/V) de ágar.

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. Foram utilizados 80 µL dessa solução por placa.

3 Soluções para SDS-PAGE:

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

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

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

3.4 Solução corante de SDS-PAGE: “*comassie brilliant blue*” 0,25% (m/V), etanol 40% (V/V) e ácido acético 10% (V/V).

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

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

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

5 Solução TBS-T 0,1%: 100 mM de TRIS-HCl; pH8,0; 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20.

6 Solução de bloqueio: TBS-T e 5% de leite em pó desnatado.

7 Solução CBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM ácido cítrico.

8 Soluções para purificação das proteínas recombinantes:

8.1 Tampão de equilíbrio: 50 mM Tris pH 6, 150 mM NaCl e 5 mM imidazol.

8.2 Tampão de lavagem: 50 mM Tris pH 6, 150 mM NaCl e 5 mM, 20 mM, 40 mM e 60 mM de imidazol.

8.3 Tampão de eluição: 50 mM Tris pH 6 ou 8, 150 mM NaCl e 300 mM imidazol.

8.4 Tampão de diálise de proteínas: 10 mM Tris pH 6 ou 8, 20 mM NaCl, 0,1% glicina.

9 Soluções para ELISA:

9.1 PBS (Tampão fosfato): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4.

9.2 PBS-T: PBS e 0,05% Tween 20 (V/V).

9.3 Tampão PBS/BSA: PBS e 1% albumina bovina sérica.

9.4 Tampão carbonato-bicarbonato: 50 mM Na_2CO_3 e 50 mM NaHCO_3 , pH 9,6.

9.5 Tampão citrato-fosfato: 100 mM citrato de sódio e 300 mM fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), pH 5,0.

9.6 Solução substrato para revelação do ELISA: tampão citrato-fosfato pH 5, 0,04% de ortofenildiamina (Sigma) e 0,01% H_2O_2 .

10 Solução substrato para revelação dos *peptide arrays*: MTT 0,12M (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio), BCIP 0,16M (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) e MgCl_2 1M em tampão CBS.

11 Anestésico para imunização: 0,2% xilazina e 0,5% quetamina em salina.

12 Anestésico para desafio: 0,2% xilazina e 1% quetamina em salina.

13 Uretano: a injeção de uma dose letal de uretano (15 mg de uretano por 10 g de massa corporal)

3.2 Clonagem do *pspA* da cepa Rx1 e de seus fragmentos e síntese do gene *pspAN-terminal*

A amplificação do *pspA2* da cepa Rx1 e de seus fragmentos foi realizada utilizando-se a enzima Taq High Fidelity (Invitrogen - Carlsbad, California, USA) de acordo com as instruções do fabricante, nas seguintes condições de temperatura: 94

°C – 4 minutos / 94 °C – 1 minuto / 50 °C – 1 minuto / 68 °C – 3 minutos / 68 °C – 7 minutos / 4 °C, realizando 30 ciclos de amplificação. Na Tabela 1 estão descritos os pares de oligonucleotídeos utilizados. Após a reação de PCR, os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o Kit GFX™ DNA and Gel Purification (GE-Healthcare - Piscataway, New Jersey, USA). Os fragmentos purificados foram então utilizados para reação de ligação no vetor pGEM-T-Easy (Promega - Madison, Wisconsin, USA). Tais reações foram mantidas a 4 °C durante 16 horas e utilizadas para transformar *E. coli* DH5- α , cuja competência foi obtida pelo método de cloreto de cálcio (Sambrook et al., 1989). As bactérias transformadas foram plaqueadas em meio sólido LB-amp contendo X-Gal para seleção de colônias brancas positivas. A extração de DNA plasmidial das colônias transformadas foi realizada utilizando-se o kit de minipreparações GFX™ (GE-Healthcare). Para a confirmação da presença do inserto, foi feita uma análise de restrição por meio do uso das enzimas *Xho*I e *Xba*I (para *pspARx1*) ou *Xho*I e *Eco*RI (para os fragmentos de *pspARx1*) e, ainda, a sequência foi confirmada por meio de sequenciamento, utilizando-se o sequenciador automático ABI Prism 3100 (PE Applied Biosystem - Carlsbad, California, USA). Após a confirmação da sequência por sequenciamento, os plasmídeos pGEM-T-*pspARx1*, pGEM-T-*frag1*, pGEM-T-*frag2*, pGEM-T-*frag3*, pGEM-T-*frag4*, pGEM-T-*frag5*, pGEM-T-*frag6* e pGEM-T-*frag7* foram digeridos com as enzimas *Xho*I e *Xba*I (para *pspARx1*) ou *Xho*I e *Eco*RI (para os fragmentos de *pspARx1*). As amostras digeridas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas de tamanho correspondente ao esperado para os insertos foram cortadas e purificadas. Os insertos foram clonados no vetor de expressão 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 Ni²⁺ (Ramos et al., 2004). Bactérias *E. coli* DH5- α foram então transformadas com os produtos dessa ligação: pAE-*pspARx1*, pAE-*frag1*, pAE-*frag2*, pAE-*frag3*, pAE-*frag4*, pAE-*frag5*, pAE-*frag6* e pAE-*frag7*. Os plasmídeos foram extraídos das bactérias transformadas utilizando-se o kit de minipreparações GFX™ (GE-Healthcare).

A síntese do gene *pspAN-terminal* (402 pb) foi realizada pela empresa BlueHeron (Botheel, Washington, USA) e a clonagem feita em vetor pUCamp. O

plasmídeo pUCamp-*pspAN-terminal* foi digerido com as enzimas *Xho*I e *Eco*RI. As amostras digeridas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% e a banda de tamanho correspondente ao esperado para o inserto foi cortada e purificada. O inserto foi clonado no vetor de expressão pAE-6xHis e *E. coli* DH5α foi então transformada com o produto dessa ligação, gerando pAE-*pspAN-terminal*. Os plasmídeos foram extraídos das bactérias transformadas utilizando-se o kit de minipreparações GFX™ (GE-Healthcare).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados nas clonagens do *pspARx1* e de seus fragmentos.

Fragmentos	Oligonucleotídeos	Pares de bases
<i>pspARx1</i>	5'TAGCTCGAGACCATGGTAAGAGCAGAAGAATCT3' 5'TAGTTATCTAGATTTTGGTGCAGGAGCTGG3'	1119
<i>frag1</i>	5'CTCGAGGTAAGAGCAGAAGAATCTCCCGTA3' 5'TTAGAATTCATCATCTTATCTGCTGCGTCTTT3'	300
<i>frag2</i>	5'CTCGAGGAGGATCAGAAGAAACTGAGGAG3' 5'TTAGAATTCCTCTAGTTTTTTAGTAAGTTCTGG3'	300
<i>frag3</i>	5'CTCGAGGATGAAGCTAAGAAACGCGAAGAA3' 5'TTAGAATTCCTCATCAATCTCTTTGAGCTCTTG3'	300
<i>frag4</i>	5'CTCGAGGAAGCTAAAGCAAAATTAGAAGAG3' 5'TTAGAATTC AAGTTGATCTTCAAGTTTTGCAAT3'	300
<i>frag5</i>	5'CTCGAGTCTGAATCAGAAGATTATGCTAAA3' 5'TTAGAATTCCTCTGGAGCTGGAGCTGGTTTTTTC3'	300
<i>frag6</i>	5'CTCGAGAAAGCTGCTGAAGAAAACAATAAT3' 5'TTAGAATTC TGATCTACGAGCATAGTCTTCTTC3'	300
<i>frag7</i>	5'TAGCTCGAGACTCCAGCCCCAGAAGCACCAGCT3' 5'TTAGAATTCACCGTTTTCTTGTTTCCAGCCTGT3'	243

A sequência destacada em azul representa o sítio de restrição de *Xho*I, a destacada em verde o de *Eco*RI e a destacada em rosa o de *Xba*I.

3.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

E. coli BL21 (Si) competentes (Invitrogen) foram transformadas com os plasmídeos pAE-*pspA1*, pAE-*pspA2*, pAE-*pspA3*, pAE-*pspA4*, pAE-*pspA4Pro*, pAE-*pspA5* (Darrieux et al., 2008; Moreno et al., 2010), pAE-*pspC3* (Ferreira et al., 2009),

pAE-*pspARx1*, pAE-*frag1*, pAE-*frag2*, pAE-*frag3*, pAE-*frag4*, pAE-*frag5*, pAE-*frag6* e pAE-*frag7* 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. Bactérias *E. coli* BL21 Star pLys competentes foram transformadas com o plasmídeo pAE-*pspAN-terminal*.

Quatro colônias resistentes à ampicilina foram inoculadas em 5 mL de meio LB/ON amp (meio sem NaCl) (para *E. coli* BL 21 (Si)) ou meio LB amp (para *E. coli* BL21 Star pLys) e crescidas a 30 °C (para *E. coli* BL 21 (Si)) ou 37 °C (para *E. coli* BL21 Star pLys) 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 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 *E. coli* BL 21 (Si)) ou 1 mM de IPTG (para *E. coli* BL21 Star pLys) para indução da 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 em tampão SDS-PAGE 1X. As alíquotas foram aquecidas a 96 °C por 10 minutos e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% ou 15% e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para analisar a expressão das proteínas antes e depois da indução.

Para a realização da 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 (para *E. coli* BL 21 (Si)) ou LB-amp (para *E. coli* BL21 Star pLys) e induzidos no mesmo protocolo de indução descrito anteriormente, por 3 horas. As células foram centrifugadas a 3200 g durante 15 minutos, ressuspensas em 30 mL de tampão de equilíbrio (Tris 50 mM pH 6 ou 8, NaCl 150 mM e Imidazol 5 mM) e lisadas no aparelho Panda (GEA Niro Soavi) (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 a Ni⁺² (Sambrook et al., 1989). Após a lise celular, o sobrenadante foi adsorvido à coluna previamente carregada com 300 mM de NiSO₄ e equilibrada com 20 mL do tampão

de equilíbrio. Lavagens subsequentes 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 de imidazol). Após a cromatografia, as frações coletadas foram separadas e analisadas em SDS-PAGE 10% ou 15% e em seguida dialisadas utilizando-se tampão de diálise. Essa solução foi deixada sob agitação constante por 16 horas a 4 °C. A dosagem das proteínas recombinantes após diálise foi determinada pelo método de Bradford (Protein Assay kit Biorad), utilizando-se BSA como padrão. As proteínas foram então estocadas a -20 °C.

3.4 Imunização de camundongos e produção dos soros anti-PspAs, anti-PspC3, anti-Frags e anti-PspAN-terminal

Os protocolos de experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB, protocolos n° 457/08 e n° 1012/13).

Para as imunizações, o lipopolissacarídeo (LPS) de cada preparação de proteína recombinante foi removido, utilizando-se um protocolo previamente descrito (Aida, Pabst, 1990). Foram adicionados 10 µL de Triton® X-114 em 1 mL das preparações das proteínas e tais soluções foram agitadas em vórtex e incubadas em gelo por 5 minutos. As soluções foram novamente agitadas em vórtex e incubadas a 37 °C por 5 minutos. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas a 37 °C por 30 segundos a 15700 g. A fase aquosa da solução foi coletada e o protocolo foi repetido por mais 4 vezes. Após este procedimento, as proteínas foram estocadas a 4 °C.

Camundongos BALB/c fêmeas de 5 a 7 semanas de idade, adquiridos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram imunizados pela via subcutânea com 5 µg de cada uma das proteínas recombinantes, utilizando-se hidróxido de alumínio (50 µg Al⁺³) como adjuvante (cada grupo contendo 6 animais).

As imunizações foram realizadas em três doses, com intervalos de quinze dias, como indicado na Figura 8. Os animais foram sangrados por punção via retrorbital 15 dias após a última imunização. O sangue coletado foi 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 8 - Esquema de imunização subcutânea de camundongos.

3.5 Coleta de soro de voluntários e pacientes humanos

Voluntários saudáveis, entre 18-60 anos, que não apresentavam contato direto com grupos de risco, (crianças, adultos imunossuprimidos, idosos e pessoas com doenças crônicas) foram recrutados de acordo com o comitê de ética de pesquisa clínica do *National Health Service (NHS)* do Reino Unido pelo grupo de pesquisa do Prof. Stephen Gordon, sob supervisão da Dra. Daniela Ferreira, da *Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM)*. Esses voluntários foram previamente avaliados por coleta de sangue e por meio de lavados nasais para avaliação da presença de *S. pneumoniae* na nasofaringe (tempo T0). No caso dos resultados negativos quanto à presença de *S. pneumoniae* no lavado nasal, esses voluntários eram reunidos no coorte A e nos casos positivos, no coorte B. Os lavados nasais foram realizados com 20 mL de solução salina, sendo cada narina lavada duas vezes com 5 mL da solução. Após a avaliação dos lavados nasais e a separação dos grupos, o coorte A recebeu então uma inoculação, na cavidade nasal, de aproximadamente 10^4 UFC de *S. pneumoniae* (Isolado BHN418, sorotipo 6B, PspA1, PspC9 – cedido pelo Dr. Peter Hermans, da Universidade de Nijmegen, Holanda)

diluídas em um volume de 100 μ L de PBS, com o auxílio de uma pipeta P200 portando ponteiros estéreis. O coorte B foi apenas mantido sob acompanhamento, sem receber a inoculação de *S. pneumoniae*, uma vez que já havia apresentado colonização natural prévia. Para o acompanhamento do estabelecimento da colonização experimental nos voluntários do coorte A, novos lavados nasais foram realizados 48 horas, 7 dias e 14 dias após a inoculação. Aqueles indivíduos que apresentaram colonização positiva foram mantidos no estudo e, após um ano, foram submetidos a um novo lavado nasal e a uma nova coleta de sangue (tempo T2) e receberam uma nova inoculação de *S. pneumoniae* (10^4 UFC do isolado BHN418) para avaliação do efeito protetor do primeiro evento de colonização experimental. Os voluntários reunidos no coorte B também foram submetidos a um novo lavado nasal e a uma nova coleta de sangue e também foram inoculados com *S. pneumoniae* (10^4 UFC do isolado BHN418) após um ano do primeiro *screening* (tempo T2). Os voluntários do coorte A apresentaram 100% de proteção e os voluntários do coorte B apresentaram 50% de proteção contra esse segundo evento de colonização.

As amostras de soro utilizadas neste trabalho são oriundas dos tempos T0 (*screening* prévio dos voluntários) e T2 (coleta após um ano do primeiro evento de colonização experimental (coorte A) ou coleta após um ano da detecção de colonização natural (coorte B)).

Além de voluntários saudáveis, o grupo do Prof. Stephen Gordon coletou amostras de sangue de pacientes internados com doenças do trato respiratório inferior no *Royal Liverpool and Broadgreen University Hospital*. Essas amostras foram coletadas 48 horas após a internação dessas pessoas. Os critérios de inclusão utilizados para esses pacientes foram: ter mais de 18 anos, presença de quadro clínico de doença respiratória (com exceção de tuberculose) ou pneumonia adquirida da comunidade (detectada por exame de raio X) e capacidade mental para passar as informações corretas para os recrutadores. Outros pacientes internados no hospital, mas sem relato de doença respiratória, foram utilizados como controle. As amostras coletadas desses pacientes, nas 48 horas após a internação, também foram utilizadas neste trabalho.

3.6 Análise de indução de anticorpos por ELISA

Placas de 96 poços de fundo chato (Maxisorp-Nunc) foram incubadas com as proteínas recombinantes (1 $\mu\text{g/mL}$) em solução Carbonato-Bicarbonato e mantidas a 4 °C por 16 horas. Posteriormente, as placas foram mantidas a 37 °C por 30 minutos e lavadas 3 vezes com PBS-T. O bloqueio foi realizado com 10% de soro fetal bovino (FBS) em PBS, a 37 °C por 30 minutos. A placa foi lavada novamente mais 3 vezes. Os soros obtidos dos camundongos imunizados, ou dos voluntários e pacientes humanos foram adicionados em diluições sequenciais em PBS/FBS 10%, seguindo-se incubação a 37 °C durante 1 hora e mais 3 lavagens com PBS-T.

No caso dos ensaios de avaliação da ligação dos MAbs (cedidos pelo Dr. David Briles, Universidade do Alabama, EUA) ou dos anticorpos anti-PspA contidos nos soros dos voluntários e pacientes humanos contra os diferentes fragmentos do PspA da cepa Rx1, a primeira diluição do soro ou anticorpo monoclonal foi fixada para conter 2 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos anti-PspA. Em seguida, anticorpos anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de humanos conjugados com peroxidase (Southern Biotech - Birmingham, Alabama, USA), diluídos em PBS/FBS 10%, foram adicionados na placa a 37 °C durante 1 hora e mais 3 lavagens foram realizadas com PBS-T. Os anticorpos foram detectados através da adição da solução substrato para revelação do ELISA. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida com 1,25 M H_2SO_4 e a absorbância a 492 nm ($A_{492\text{nm}}$) foi determinada. A concentração de anticorpos foi estabelecida a partir de curva padrão obtida com a utilização de IgG de camundongo (Southern Biotech) ou com a utilização de soro humano padrão. As diferenças entre o nível dos anticorpos foi analisada pelo teste *t*-Student.

3.7 Síntese dos peptídeos em suporte sólido

Peptide arrays (CelluSpots™ - Intavis) cobrindo as sequências completas dos PspAs dos clados 1 a 5 (PspA1 expresso pela cepa 435/96 (Número de acesso no GeneBank: AY082387), PspA2 expresso pela cepa 371/00 (Número de acesso no GenBank: EF649968), PspA3 expresso pela cepa 259/98 (Número de acesso no

GenBank: AY082389), PspA4 expresso pela cepa 255/00 (Número de acesso no GenBank: EF649969) e PspA5 expresso pela cepa 122/02 (Número de acesso no GenBank: EF649970), do PspA2 expresso pela cepa Rx1 (Número de acesso no GenBank: M74122.1), do PspA1 expresso pelo isolado BHN418 (sorotipo 6B) e do PspC3 expresso pela cepa 491/00 (Número de acesso no GenBank: EF424119.1), foram comprados da empresa Intavis. As sequências peptídicas sintetizadas nos *peptide arrays* encontram-se nos Apêndices A e B. Os peptídeos foram sintetizados com tamanho de 15 aminoácidos e com sobreposição de 11 aminoácidos. CelluSpots™ são matrizes do conjugado peptídeos-celulose aderidos a uma superfície de vidro (Figura 9). Nesse método, os peptídeos são primeiramente sintetizados em uma superfície de celulose e posteriormente dissolvidos em ácido trifluoroacético (TFA). A síntese é feita seguindo-se o protocolo interno da empresa, que é baseado nos trabalhos de Frank (Frank, 1992; Frank, 2002). Resumidamente, essa síntese se inicia com a adsorção dos peptídeos à membrana de celulose pelo grupo C-terminal do último aminoácido da sequência do peptídeo. Todos os aminoácidos acrescentados possuem o grupo amino protegido por um grupo Fmoc (fluorenil metoxi-carbonila). A retirada do grupo Fmoc se dá com o acréscimo de piperidina, permitindo a liberação do grupo amina e, portanto, a ligação do próximo aminoácido da sequência peptídica (Figura 10). A eficiência deste passo pode ser monitorada pela reação com o azul de bromofenol, que apresenta coloração azul quando em contato com grupamentos amina livres. Os aminoácidos a serem acoplados são ativados por DIPC/HOBT (diisopropilcarbodiimida/hidroxibenzotriazol) e depositados sobre a membrana. As funções NH₂ que permanecem livres após o acoplamento são acetiladas com anidrido acético em DMF, a fim de se evitar reações colaterais com os aminoácidos posteriormente adicionados. Ao final da síntese, os grupos laterais protetores dos aminoácidos são retirados pelo tratamento da membrana com ácido trifluoroacético (TFA).

Figura 9 - Figura ilustrativa do produto CelluSpots™ comercializado pela Intavis (Fonte: http://www.intavis.com/en/Custom_Peptide_Synthesis/peptidearrays/index.php).

Figura 10 - Esquema ilustrativo simplificado do processo de síntese dos peptídeos em membrana de celulose. O ciclo esquematizado é repetido até que todos os peptídeos estejam formados.

3.8 Ensaios de imunodeteccão com os *peptide arrays*

Para realização dos ensaios, os *peptide arrays* foram inicialmente incubados em solução de bloqueio, permanecendo 16 horas a 4 °C. Em seguida, os *peptide arrays* foram incubados durante 4 horas à temperatura ambiente (TA), sob agitação, com os soros dos animais imunizados com PspA1+Alum, PspA2+Alum, PspA3+Alum, PspA4+Alum, PspA4Pro+Alum, PspA5+Alum, PspC3+Alum ou PspAN-terminal+Alum, ou com soros de voluntários ou pacientes humanos, ou ainda com os MAbs. Os soros ou MAbs (contendo aproximadamente 10 µg/mL de anticorpo) foram diluídos em solução de bloqueio. Passadas as 4 horas, os *peptide arrays* foram lavados rapidamente com TBS-T e, em seguida, lavados mais 3 vezes durante 5 minutos cada, com essa mesma solução. Após a lavagem, eles foram então incubados durante 2 horas à TA, sob agitação, com anticorpo anti-IgG de camundongo ou com anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina (Sigma Aldrich - St. Louis, Missouri, USA), em uma diluição de 1:5000 em TBS-T. Em seguida, foram novamente lavados 3 vezes com TBS-T, durante 5 minutos, lavados 1 vez com tampão CBS, durante 5 minutos e, finalmente, incubados por 20 minutos (nos ensaios com soros de camundongo e com os MAbs) ou por 1 hora (no caso dos soros de voluntários e pacientes humanos) à TA em solução substrato de revelação, que promove a reação colorimétrica nos *spots* positivos.

3.9 Immunoblotting

As proteínas recombinantes PspARx1, Frag 1, Frag 2, Frag 3, Frag 4, Frag 5, Frag 6 e Frag 7 (4 µg de cada uma) foram separadas em SDS-PAGE 15% e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi então incubada em solução de bloqueio, por 16 horas a 4 °C, para o bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação. Em seguida, a membrana foi incubada durante 2 horas com o anticorpo monoclonal (10 µg/mL) em solução de bloqueio. A membrana foi então lavada três vezes por 10 minutos com TBS-T. Para a imunodeteccão, foi realizada uma incubação de 1 hora com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com

peroxidase (Sigma) na diluição (1:1000) e a detecção foi feita com o kit quimioluminescente ECL (GE - Heathcare).

3.10 Análise por citometria de fluxo da ligação de anticorpos IgG anti-frags e IgG anti-PspAN-terminal à superfície da bactéria

Estoques das cepas D39 (sorotipo 2, PspA2), ATCC6303 (sorotipo 3, PspA 5) ou 3JYP2670 (sorotipo 3, PspA4) de *S. pneumoniae* foram descongelados, semeados em ágar sangue e incubados a 37 °C durante 16 horas e, em seguida, inoculadas em meio THY até DO_{600nm} 0,4-0,5 (10^8 UFC/mL). Os cultivos foram então centrifugados a 2000 g durante 5 minutos e, em seguida, as bactérias foram lavadas duas vezes com PBS e então incubadas com 1% de soro por 30 min a 37 °C (volume final de 100 µL por reação). As bactérias foram novamente lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com FITC (1:1000) (Sigma-Aldrich). Finalmente, após duas novas lavagens com PBS, as bactérias foram ressuspensas e fixadas em paraformaldeído 2% e analisadas por citometria de fluxo com o 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 Desafio de sobrevivência de camundongos

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal (ip) com 200 µL de uma mistura contendo 0,2% xilazina e 1,0% quetamina. Em seguida, os animais foram desafiados pela via intranasal (in) com 50 µl de uma solução contendo 3×10^5 UFCs da cepa ATCC6303 (sorotipo 3, PspA5) ou 10^6 da cepa A66.1 (sorotipo 3, PspA2) de *S. pneumoniae* 15 dias após a última imunização e a sobrevivência foi acompanhada durante 10 dias. A diferença no nível de sobrevivência entre os grupos foi analisada pelo teste exato de Fisher.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão e purificação dos PspAs e PspC3 recombinantes

Células de *E. coli* transformadas com os vetores pAE-6xHis contendo os fragmentos de *pspA* e *pspC3* foram cultivadas e induzidas para expressão das proteínas recombinantes. A proteína recombinante PspA4Pro já havia sido purificada em nosso laboratório. A região rica em prolinas de PspA (Hollingshead et al., 2000) pode apresentar um bloco sem prolinas (NonPro) interno. PspA4 possui uma região C-terminal composta por Pro-NonPro-Pro, enquanto que PspA4Pro possui apenas o primeiro bloco Pro.

A Tabela 2 indica a massa molecular e o pI preditos para essas moléculas.

Tabela 2 - Massa molecular e o valor de pI preditos dos PspAs e PsC3.

Proteínas	Massa Molecular (kDa)	pI
PspA1	38,1	4,95
PspA2	39,4	5,90
PspA3	40,0	5,01
PspA4	49,4	4,96
PspA5	45,9	4,84
PspC3	45,8	8,60

A análise dos cultivos por SDS-PAGE 10% revelou que todas as proteínas recombinantes foram expressas (Figura 11). As bandas observadas no gel apresentam massa molecular acima do predito. De fato, a migração anômala de PspA e PspC está descrita na literatura (Yother, Briles, 1992).

Figura 11 - Análise da expressão dos PspAs e PspC3 em *E.coli* BL21 (Si). Extratos totais de *E. coli* BL21 (Si) transformadas com pAE-6xHis contendo os diferentes insertos, antes da indução (NI) e após a indução (I) com 300 mM de NaCl, foram submetidos a SDS-PAGE 10%. As bandas indicadas correspondem às proteínas recombinantes. A migração do padrão de massa molecular (PM – em kDa) está indicada na coluna 1.

Após a análise da expressão inicial dos fragmentos de PspA e PspC3, os cultivos foram preparados em maior volume para a purificação das proteínas recombinantes a partir da fração solúvel dos lisados bacterianos. O sobrenadante dos lisados foi submetido à cromatografia em resina quelante de Ni^{+2} e frações de todas as etapas da purificação foram coletadas. Após a purificação, todas as frações de lavagens e as eluições foram analisadas por SDS-PAGE 10% para a visualização da fração na qual a proteína se encontrava. Em seguida, essas frações que continham cada uma das proteínas recombinantes foram misturadas e dialisadas. A Figura 12 mostra os fragmentos de PspA e PspC3 purificados e dialisados.

Figura 12 - Análise por SDS-PAGE 10% dos PspAs purificados e dialisados. As proteínas PspA1 (1), PspA2 (2), PspA3 (3), PspA4 (4), PspA5 (5) e PspC3 (6) foram purificadas e analisadas por SDS-PAGE 10%. PM indica o padrão de massa molecular em kDa.

4.2 Avaliação de anticorpos anti-PspAs e anti-PspC de camundongos

4.2.1 Análise por ELISA da indução de anticorpos anti-PspAs e anti-PspC3 em camundongos

Camundongos BALB/c foram imunizados com as proteínas recombinantes PspA1, PspA2, PspA3, PspA4, PspA4Pro, PspA5 e PspC3 (com o adjuvante Alum), e os soros foram coletados em *pool*. A análise da indução de anticorpos por ELISA indicou as concentrações de IgG anti-PspA ou anti-PspC indicadas na tabela 3.

Tabela 3 - Concentração de IgG anti-PspA ou anti-PspC obtida após imunização de camundongos BALB/c com as proteínas PspA1, PspA2, PspA3, PspA4, PspA4Pro, PspA5 ou PspC3.

Proteína	Concentração de IgG em µg/mL
PspA1	2500
PspA2	2800
PspA3	2400
PspA4	2300
PspA4Pro	2500
PspA5	2600
PspC3	320

4.2.2 Ensaios de imunodeteção com os soros anti-PspAs e anti-PspC3 de camundongos utilizando peptide arrays

Foram sintetizados dois grupos de *peptide arrays*, o primeiro grupo contendo as sequências dos PspAs 1, 3, 4 e 5 (Apêndice A) e o segundo grupo contendo as sequências do PspA2 expresso pela cepa 371/00, do PspA2 expresso pela cepa Rx1, do PspA1 expresso pelo isolado BHN418 (sorotipo 6B) e do PspC3 expresso pela cepa 491/00 (Apêndice B).

Com o intuito de avaliar possíveis ligações inespecíficas do anticorpo comercial conjugado à fosfatase alcalina aos peptídeos contidos nos *peptide arrays*, inicialmente foi realizado um ensaio de imunodeteção sem utilizar qualquer soro de animal imunizado, sendo usado somente o anticorpo comercial anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Figura 13). Os resultados obtidos mostram não haver qualquer reação inespecífica tanto no primeiro como no segundo grupo de *peptide arrays*.

Figura 13 - Ensaio de Imunodeteção realizados com o primeiro grupo (A) e segundo grupo (B) de *peptide arrays* incubados somente com anticorpo comercial anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (diluição 1:5000). Os *peptide arrays* apresentam-se em forma de duplicata, sendo o *spots* do lado esquerdo perfeitamente reproduzidos do lado direito.

Após essa avaliação inicial, seguiram-se os ensaios de imunodeteção realizados com o primeiro grupo de *peptide arrays*, utilizando-se o *pool* dos soros dos animais injetados apenas com Alum ou imunizados com PspA1+Alum, PspA2+Alum, PspA3+Alum, PspA4+Alum, PspA4Pro+Alum ou PspA5+Alum (Figura 14 A-G).

CelluSpots™
www.intavis.com
 LOT: 360-001-017 – PspA-001

(B)

CelluSpots™
www.intavis.com
 LOT: 360-001-006 - Price: 001

(C)

CelluSpots™
www.intavis.com
LOT: 360,001,008 Date: 4/2004

(D)

(E)

Figura 14 - Ensaio de imunodeteção realizado com soro dos animais injetados apenas com Alum (A), imunizados com PspA1+Alum (B), PspA2+Alum (C), PspA3+Alum (D), PspA4+Alum (E), PspA4Pro+Alum (F) ou PspA5+Alum (G) – Primeiro grupo de *peptide arrays*. Foram utilizados aproximadamente 10 µg/mL de IgG anti-PspAs contidos no soro dos animais imunizados. O anticorpo comercial anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000.

No ensaio realizado com o soro dos animais injetados apenas com Alum, observa-se nenhum *spot* reativo.

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro dos animais imunizados com PspA1+Alum mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 4. O soro anti-PspA1 reconheceu diferentes peptídeos na sequência de PspA1, por ser a proteína homóloga e, de maneira geral, reconheceu peptídeos semelhantes nas sequências de PspA3, PspA4 e PspA5.

Tabela 4 - Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA1+Alum no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A4/A5	D-Y-D-A-A-V-K-K-Y-E-A	PspA1
A8/A9	E-D-G-K-A-A-Q-K-K-Y-E	PspA1
A16/A17/A18	K-Y-Q-Q-E-L-V	PspA1
B23/B24	E-S-D-S-E-D-Y-V	PspA1
C14	S-D-G-E-Q-A-G-Q-Y-L-A-A-A-E-E	PspA1
D16/D17	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA3
H5/H6	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA4
K4/K5	N-N-V-E-D-Y-I-K-E-G	PspA4
L14/L15	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA5
N13/N14	N-N-V-E-D-Y-I-K-E-G	PspA5
O15/O16	N-N-V-E-D-Y-V-K-E-G	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro dos animais imunizados com PspA2+Alum mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 5. O soro anti-PspA2 apresentou baixo número de *spots* positivos, sendo reconhecidos peptídeos apenas nas sequências de PspA1, PspA4 e PspA5, sendo semelhantes os peptídeos reconhecidos nos dois últimos.

Tabela 5 - Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA2+Alum no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
B16/B17	E-V-A-P-Q-A-K-I	PspA1
B23/B24	E-S-D-S-E-D-Y-V-K	PspA1
K4/K5	N-N-V-E-D-Y-I-K-E-G	PspA4
L15	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-D-Q-K	PspA5
N13/N14	N-N-V-E-D-Y-I-K-E-G	PspA5
O15/O16	N-V-E-D-Y-V-K-E-G	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro dos animais imunizados com PspA3+Alum mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 6. O soro anti-PspA3 foi capaz de reconhecer um grande número de *spots*, especialmente na sequência de PspA3, por ser a proteína homóloga. De maneira geral, os *spots* reconhecidos nas outras sequências são de peptídeos semelhantes entre si.

Tabela 6 - Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA3+Alum no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A1	V-R-A-E-E-A-P-V-A-S-Q-S-K-A-E	PspA1
A4/A5	D-Y-D-A-A-V-K-K-Y-E-A	PspA1
A8/A9	E-D-G-K-A-A-Q-K-K-Y-E	PspA1
D1/D2	A-P-K-P-E-Q-P-A	PspA1
D8	V-R-A-E-E-A-P-V-A-S-Q-S-K-A-E	PspA3
D13/D14	S-E-A-A-K-K-H-Y-E-E-V	PspA3
D16/D17	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA3
E7	A-T-Q-R-K-D-E-A-E-A	PspA3
E11	V-V-P-E-P-S-E-L-A-E	PspA3
E22/E23	K-E-L-E-I-E-K-L-Q-Y-E	PspA3
G5	D-S-E-D-D-T-A-A	PspA3
G19	P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P-A-Q-P-K	PspA3
G21	V-R-A-E-E-A-P-V-A-S-Q-S-K-A-E	PspA4
H5/H6	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA4
L14/L15	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA5
P4/P5/P6	A-P-K-P-E	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro dos animais imunizados com PspA4+Alum mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 7. O soro anti-PspA4 foi capaz de reconhecer poucos *spots*, estando grande parte localizada na sequência de PspA4. De maneira geral, os *spots* reconhecidos nas outras sequências são de peptídeos semelhantes.

Tabela 7 - Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA4+Alum no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A3	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA1
D10	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA3
D17	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-G-Q-K	PspA3
E18	K-R-K-Y-D-Y-A-T-L-K-V-A-L-A-K	PspA3
G23	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-M-K	PspA4
H6	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-G-Q-K	PspA4
H15	E-V-Q-N-A-Y-V-K-Y-Q-R-V-Q-R	PspA4
I5	P-E-P-T-E-L-A-K-D-Q-R-K-A-E-E	PspA4
K23	E-E-D-Y-A-R-R-S-E-E-E-Y-N-R-L	PspA4
L8	A-N-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro dos animais imunizados com PspA4Pro+Alum mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 8. O soro anti-PspA4Pro foi capaz de reconhecer mais *spots*, quando comparado ao soro anti-PspA4, estando grande parte localizada na sequência de PspA4. De maneira geral, os *spots* reconhecidos nas outras sequências são de peptídeos semelhantes.

Tabela 8 - Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA4Pro+Alum no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A3/A4	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A	PspA1
A5/A6	A-V-K-K-Y-E-A-A-K-K-E	PspA1
A8	K-K-E-Y-E-D-G-K-A-A-Q-K-K-Y-E	PspA1
D9/D10	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A	PspA3
D16/D17	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA3
G22/G23	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A	PspA4
H3/H4	K-K-A-Y-E-E-A-K-K-K-A	PspA4
H5/H6	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA4
I5	P-E-P-T-E-L-A-K-D-Q-R-K-A-E-E	PspA4
I10	K-V-A-K-R-K-Y-D-Y-A-T-L-K-V-A	PspA4
I15/I16	E-A-E-L-D-N-K-A-E-N-L	PspA4
J4	S-N-G-E-Q-A-E-Q-Y-L-A-A-A-E-K	PspA4
L7/L8	A-N-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A	PspA5
L13/L14/L15	K-K-A-E-D-A-Q	PspA5
N13	D-A-E-E-N-N-V-E-D-Y-I-K-E-G-L	PspA5
O5	D-K-E-A-A-E-D-A-N-I-E-A-L-Q-N	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro dos animais imunizados com PspA5+Alum mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 9. O soro anti-PspA5 foi capaz de reconhecer um grande número de *spots*, especialmente na sequência de PspA5. De maneira geral, os *spots* reconhecidos nas outras sequências são de peptídeos semelhantes.

Tabela 9 - Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA5+Alum no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos Reconhecidos	Molécula Reconhecida
A3/A4	K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA1
A5/A6	A-V-K-K-Y-E-A-A-K-K-E	PspA1
A8	K-K-E-Y-E-D-G-K-A-A-Q-K-K-Y-E	PspA1
D10	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA3
D16/D17	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA3
H5/H6	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA4
K5	T-N-N-V-E-D-Y-I-K-E-G-L-E-E-A	PspA4
L7/L8	A-N-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA5
L10	D-Y-D-A-A-V-K-K-S-E-A-A-K-K-D	PspA5
L14/L15	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA5
M19/M20	E-V-A-K-E-K-Y-D-K-A-V	PspA5
N4/N5	K-G-I-A-P-Y-Q-N	PspA5
N13/N14	N-N-V-E-D-Y-I-K	PspA5

Após os ensaios realizados com o primeiro grupo de *peptide arrays*, foram iniciados os experimentos com o segundo grupo, contendo as sequências de PspA2 e PspC3, que não puderam ser sintetizadas no primeiro grupo de *peptide arrays* comprados. Nesses ensaios, com exceção dos soros anti-PspA2 e anti-PspC3, que reconheceram peptídeos dentro das sequências de PspA2 e PspC3 (Figura 15), respectivamente, como esperado, todos os outros soros não foram capazes de reconhecer qualquer *spot* (resultados não apresentados).

Figura 15 - Ensaios de imunodeteção realizados com soro dos animais imunizados com PspA2+Alum (A) ou PspC3+Alum (B). Foram utilizados aproximadamente 10 µg/mL de IgG anti-PspA2 ou anti-PspC3 contidos no soro dos animais imunizados. O anticorpo comercial anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000.

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro dos animais imunizados com PspA2+Alum mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 10. O soro anti-PspA2 foi capaz de reconhecer apenas quatro *spots* dentro da sequência de PspA2, sendo os peptídeos semelhantes.

Tabela 10 - Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspA2+Alum no segundo grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
C16/C17	N-N-V-E-D-Y-F-K-E-G-L	PspA2
F12/F13	N-N-V-E-A-Y-F-K-E-G-L	PspA2

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro dos animais imunizados com PspC3+Alum mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 11. O soro anti-PspC3 foi capaz de reconhecer um grande número de *spots* dentro da sequência de PspC3, tendo reconhecido peptídeos envolvidos na ligação de Fator H (K-L-S-R-I-K-T) e sIgA (R-N-Y-P-T/S) humanos.

Tabela 11 - Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspC3+Alum no segundo grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
G9/G10	I-N-K-M-I-Q-L-D-K-R-K	PspC3
G13/G14/G15	K-L-S-R-I-K-T	PspC3
G19/G20	L-P-S-K-I-K-A-E-L-D-A	PspC3
G22/G23	F-K-Q-F-K-K-D-T-L-P-T	PspC3
H7/H8	E-D-R-R-N-Y-P-T-N-T-Y	PspC3
H21	V-E-S-K-K-A-E-A-T-R-L-E-N-I-K	PspC3
I7/I8	V-P-G-E-L-A-T-P-D-K-K	PspC3
I21/I22	E-E-D-R-R-N-Y-P-S-N-T	PspC3

A sequência destacada em verde indica o sítio de ligação ao Fator H e as sequências destacadas em azul indicam o sítio de ligação à sIgA.

A Figura 16 mostra o alinhamento de todas as sequências de PspA dos dois grupos de *peptide arrays* avaliados e os peptídeos reconhecidos por cada soro. De maneira geral, a maioria dos peptídeos foi reconhecida na região N-terminal das sequências de PspA.

Figura 16 - Esquema ilustrativo da localização nas sequências dos PspAs dos peptídeos reconhecidos por todos os soros nos ensaios de imunodeteccção.

4.3 PspAN-terminal

4.3.1 Gene *pspAN-terminal* e proteína recombinante *PspAN-terminal*

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios com os *peptide arrays*, foi desenhado um gene capaz de expressar uma repetição da porção inicial da região N-terminal de PspA (*pspAN-terminal*) (Figura 17). O gene é composto por 3 repetições dos códons que codificam os 39 primeiros aminoácidos da região N-terminal da proteína PspA4. Foi escolhida a sequência do PspA4 por ser esta a molécula que apresentou maior reatividade cruzada em ensaios de *immunoblotting* em trabalhos anteriores do nosso laboratório. Foram utilizadas seis glicinas entre as repetições (link), com o intuito de que cada repetição pudesse manter uma estrutura mais independente da outra. O gene *pspAN-terminal* foi subclonado a partir do vetor pUCamp-*pspAN-terminal* (obtido da empresa BlueHeron (EUA)) em vetor pAE. Foi realizada uma digestão com as enzimas *XhoI* e *EcoRI* para a confirmação da presença do inserto (Figura 18).

Figura 17 - Ilustração do gene sintético *pspAN-terminal*. O gene é composto por 3 repetições dos códons que codificam os 39 primeiros aminoácidos da região N-terminal da proteína PspA4. Foram utilizadas seis glicinas entre as repetições (link), com o intuito de que cada repetição pudesse manter uma estrutura mais independente da outra. Os sítios de restrição das enzimas *XhoI* e *EcoRI* foram inseridos no início e no fim da sequência, respectivamente, para a clonagem do gene no vetor de expressão pAE.

Figura 18 - Análise da digestão do plasmídeo pAE-*pspAN-terminal* com as enzimas *XhoI* e *EcoRI*. A figura indica três clones selecionados, antes (ND) e após a digestão (D). Apenas dois clones apresentavam o inserto (com 402 pb). O padrão de tamanho (PM) em pares de bases (pb) está indicado na primeira coluna.

Após a confirmação da presença do inserto, um dos clones foi selecionado e células de *E. coli* BL21 Star pLys foram transformadas com o plasmídeo pAE-*pspAN-terminal*, cultivadas e induzidas para expressão da proteína recombinante (Figura 19). A proteína recombinante possui massa molecular de 14,6 kDa e pI de 9,1 preditos. O componente proteico observado no gel apresenta massa molecular acima do predito.

Figura 19 - Análise da expressão do PspAN-terminal em *E.coli* BL21 Star pLys. Extratos totais de *E. coli* BL21 Star pLys transformadas com pAE-*pspAN-terminal*, antes da indução (NI) e após a indução (I) com 1 mM de IPTG, foram submetidos a SDS-PAGE 15%. As bandas indicadas correspondem às proteínas recombinantes. A migração do padrão de massa molecular (PM – em kDa) está indicada na coluna 1.

Após a análise da expressão inicial da proteína PspAN-terminal, o cultivo foi preparado em maior volume e o sobrenadante do lisado submetido à cromatografia em resina quelante de Ni^{+2} . Frações de todas as etapas da purificação foram coletadas. Após a purificação, todas as frações de lavagens e as eluições foram analisadas por SDS-PAGE 15% para a visualização da fração na qual a proteína se encontrava. Em seguida, essas frações que continham a proteína recombinante foram misturadas e dialisadas. A Figura 20 mostra o fragmento PspAN-terminal purificado.

Figura 20 - Análise por SDS-PAGE 15% do PspAN-terminal purificado e dialisado. O fragmento PspAN-terminal foi purificado e analisado por eletroforese em gel de SDS-PAGE 15%. PM indica o padrão de massa molecular em kDa.

4.3.2 Análise por ELISA da indução de anticorpos anti-PspAN-terminal em camundongos

Camundongos BALB/c foram imunizados com a proteína recombinante PspAN-terminal, seguindo-se o mesmo regime utilizado na imunização para a obtenção dos soros anti-PspAs e anti-PspC3. Os soros foram coletados em *pool* e a análise da indução de anticorpos por ELISA indicou a concentração de 646 $\mu\text{g/mL}$ de IgG anti-PspAN-terminal.

4.3.3 Ensaios de imunodeteção com o soro anti-PspAN-terminal utilizando *peptide arrays*

Com o intuito de avaliar se o dobramento adquirido pela proteína PspAN-terminal permitiu a geração de anticorpos contra a região inicial N-terminal de interesse, foi realizado um ensaio de imunodeteção utilizando-se o primeiro grupo de *peptide arrays* (Figura 21).

Figura 21 - Ensaio de imunodeteção realizado com soro dos animais imunizados com PspAN-terminal+Alum. Foram utilizados aproximadamente 10 µg/mL de IgG anti-PspAN-terminal contidos no soro dos animais imunizados. O anticorpo comercial anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000.

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro dos animais imunizados com PspAN-terminal+Alum mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 12. O soro anti-PspAN-terminal foi capaz de reconhecer os peptídeos localizados na região inicial N-terminal em todos os PspAs representados no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Tabela 12 - Peptídeos reconhecidos pelo soro dos animais imunizados com PspAN-terminal+Alum no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do <i>spot</i> reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A2/A3	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA1
D9/D10	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA3
D16/D17	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA3
G22/G23	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA4
H5/H6	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA4
H22	E-I-D-E-E-I-N-K-A-K-Q-I-L-N-E	PspA4
L7/L8	A-N-Q-S-K-A-E-K-D-Y-Q	PspA5
L15	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-D-Q-K	PspA5
L17	K-Y-D-E-D-Q-K-K-T-E-E-K-A-E-L	PspA5

4.3.4 *Análise por ELISA da reatividade cruzada dos anticorpos anti-PspAN-terminal*

Para avaliar o potencial de reatividade cruzada dos anticorpos gerados contra a proteína PspAN-terminal, o soro dos animais imunizados com essa molécula foi utilizado em ensaios de ELISA, tendo-se como *coating* os PspAs dos clados 1 a 5 e o próprio PspAN-terminal (Figura 22).

Figura 22 - Análise da reatividade cruzada dos anticorpos anti-PspAN-terminal contra os PspAs dos clados 1 a 5. Foram utilizados os valores de densidade óptica (492 nm) da diluição 1:200 do soro anti-PspAN-terminal.

A Figura 22 indica que os anticorpos anti-PspAN-terminal foram capazes de reconhecer todos os PspAs, tendo sido os PspAs 3, 4 e 4Pro os mais reconhecidos, além do próprio PspAN-terminal.

4.3.5 Ensaios funcionais de ligação de anticorpos anti-PspAN-terminal à superfície do pneumococo

Uma vez que os anticorpos anti-PspAN-terminal foram capazes de reconhecer os peptídeos da região inicial N-terminal no ensaio de imunodeteção e foram capazes de reconhecer os diferentes PspAs no ensaio de ELISA, foi realizado um ensaio funcional de ligação com a intenção de avaliar a capacidade de ligação desses anticorpos à superfície do pneumococo (Figura 23).

Figura 23 - Ensaio de ligação dos anticorpos anti-PspAN-terminal às cepas ATCC6303 (PspA5) (A) e 3JYP2670 (PspA4) (B). Os anticorpos contidos no soro de animais imunizados com PspAN-terminal foram testados quanto à capacidade de ligarem-se à superfície do pneumococo. As bactérias foram incubadas com 1% de soro. O soro dos animais injetados apenas com Alum foi utilizado como controle (área cinza). A mediana da fluorescência das bactérias está indicada dentro dos parentêses em cada amostra.

Os resultados mostrados na figura 23 indicam que os anticorpos anti-PspAN-terminal não são capazes de se ligar à superfície do pneumococo.

4.3.6 Desafio de sobrevivência de camundongos imunizados com PspAN-terminal

Para avaliar a capacidade protetora da imunização com a proteína PspAN-terminal, os camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante foram então desafiados com a linhagem de pneumococo ATCC6303, quinze dias após a última imunização, e a sobrevivência acompanhada por 10 dias. Nenhum camundongo imunizado com PspAN-terminal foi capaz de sobreviver ao desafio.

4.4 Avaliação de anticorpos monoclonais em ensaios de imunodeteção utilizando *peptide arrays*

Na tentativa de elucidar a real importância da região inicial N-terminal na proteção conferida por PspA, foram utilizados MAb's cedidos pelo Dr. David E. Briles

(Tabela 13) para ensaios de imunodeteção com os *peptide arrays*. Como esses MAbs foram produzidos contra a proteína PspA da cepa Rx1, foi utilizado o segundo grupo de *peptide arrays*. Utilizando-se 10 µg/mL ou 100 µg/mL dos MAbs, nenhum *spot* positivo foi detectado (Figura 24).

Tabela 13 - Lista de MAbs produzidos contra o PspA da cepa Rx1 cedidos pelo Dr. David E. Briles.

Anticorpo Monoclonal (MAb)	Isotipo	Clado reconhecido
1B2.21	IgG1-K	2
8B2.19	IgG1-K	2
RX1MI-003	IgG2	2
RX1MI-005	IgG1-K	2
RX1MI-006	IgG2b-K	2
RX1MI-007	IgG2b	2

Figura 24 - Ensaio de imunodeteção realizado com os MAbs produzidos contra o PspA da cepa Rx1, utilizando o segundo grupo de *peptide arrays*. O anticorpo comercial anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000.

Também foram testados MAbs cedidos pelo Dr. David E. Briles que foram produzidos contra a região rica em prolinas do PspA1 da cepa AC094 (MAbs 1A4.7, 5C4.7 e 6A5.12) (Figura 25). Os ensaios de imunodeteção realizados com esses MAbs mostraram reatividade nos *spots* indicados na tabela 14. Todos os MAbs reconheceram peptídeos na região rica em prolinas das variantes de PspA presentes no primeiro grupo de *peptide arrays*, como esperado. O MAb 1A4.7 reconheceu fracamente apenas três *spots*, sendo dois deles compostos por uma

sequência peptídica pertencente ao bloco NonPro da região de prolinas. O MAb 5C4.7 foi o que reconheceu o maior número de *spots* e o único que não reconheceu qualquer peptídeo na sequência do PspA4 ou do bloco NonPro. O MAb 6A5.12 reconheceu o mesmo *spot* contendo a sequência pertencente ao bloco NonPro que o MAb 11A4.7 havia reconhecido.

(A)

(B)

(C)

Figura 25 - Ensaio de imunodeteção realizados com os MAb's produzidos contra a região rica em prolinas do PspA1 da cepa AC094, utilizando o primeiro grupo de *peptide arrays*. Foram utilizados aproximadamente 10 µg/mL de cada um dos MAb's. O anticorpo comercial anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000.

Tabela 14 - Peptídeos reconhecidos pelos MABs produzidos contra a região rica em prolínas do PspA1 da cepa AC094.

MAB	Localização do <i>spot</i> reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
1A4.7	K14	L-G-P-D-G-D-E-E-E-T-P-A-P-A-P	PspA4
	K23/K24	A-R-R-S-E-E-E-Y-N-R-L	PspA4
5C4.7	C24/D1/D2	A-P-K-P-E-Q-P	PspA1
	G17/G18/G19/G20	P-A-P-A-P-K-P	PspA3
	P4/P5/P6	A-P-K-P-E-Q-P-A-S	PspA5
6A5.12	K23/K24	A-R-R-S-E-E-E-Y-N-R-L	PspA4

Os peptídeos destacados em negrito foram igualmente reconhecidos pelos MABs 1A4.7 e 6A5.12.

4.5 PspA da cepa Rx1 e seus fragmentos

4.5.1 Clonagem do *pspA* da cepa Rx1 e de seus fragmentos

Pelo fato de não ter sido observada reação positiva em nenhum dos peptídeos lineares nos *peptide arrays* com os MABs produzidos contra o PspA da cepa Rx1, foi realizada a construção de fragmentos de 100 aminoácidos desse PspA (com exceção do Frag 7 que possui 81 aminoácidos), com sobreposições de 50 aminoácidos (Figura 26). A hipótese seria que esses monoclonais reconheceriam epitopos conformacionais não-contínuos na sequência linear da proteína. Esses epitopos não estariam nos peptídeos de 15 aminoácidos dos *peptide arrays*, mas estariam presentes em fragmentos maiores com uma estrutura tridimensional semelhante àquela da proteína nativa. A proteína inteira madura sem a região de ancoramento e parte da região rica em prolínas (PspARx1) também foi clonada para ser utilizada como controle.

Figura 26 - Figura ilustrativa do PspARx1 e seus fragmentos. Os fragmentos possuem 100 aminoácidos (com exceção do Frag7, que possui 81) com sobreposição de 50 aminoácidos. No lado direito da figura estão indicados os aminoácidos iniciais e finais de cada um dos fragmentos.

Para a obtenção dos fragmentos gênicos codificando a proteína PspARx1 e cada um dos seus fragmentos, foi realizada amplificação por PCR a partir de colônias frescas da cepa Rx1. 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% (Figuras 27 A e B).

(A)

(B)

Figura 27 - Análise da digestão dos plasmídeos pAE-*pspARx1* (A) e pAE-*frags* (B) com as enzimas *XhoI* e *EcoRI*. A figura indica os plasmídeos antes (ND) e após a digestão (D). (A) Nos poços 2-5, encontram-se o pAE vazio (pAE 0) e os clones 1, 2 e 3 do pAE-*pspARx1* não digeridos, respectivamente. Nos poços 7-10 encontram-se o pAE vazio e os clones 1, 2 e 3 do pAE-*pspARx1* digeridos com *XhoI* e *EcoRI*, respectivamente. O padrão de tamanho (PM) em pares de bases (pb) está indicado nos poços 1 e 6. (B) Nos poços 2 e 3, encontram-se o pAE vazio não digerido e digerido, respectivamente. Todos os outros poços contêm os pAE-*frags* (1 a 7) não digeridos e digeridos com as enzimas *XhoI* e *EcoRI*, respectivamente. Todos os fragmentos apresentam 300 pb, com exceção do frag 7 que apresenta 243 pb. O padrão de tamanho (PM) em pares de bases (pb) está indicado no primeiro poço.

4.5.2 Expressão e purificação do *PspARx1* e dos seus fragmentos

Após a confirmação da presença do inserto, células de *E. coli* BL21 (Si) foram transformadas com os plasmídeos pAE-*pspARx1* ou pAE-*frags*, cultivadas e induzidas para expressão das proteínas recombinantes (Figura 28 A, B, C e D).

Figura 28 - Análise da expressão do PspARx1 e dos Frags em *E.coli* BL21 (Si). Extratos totais de *E. coli* BL21 (Si) transformadas com pAE-*pspARx1* (A) pAE-*frag1*, pAE-*frag2*, pAE-*frag3*, pAE-*frag6* e pAE-*frag7* (B) pAE-*frag4* (C) e pAE-*frag5* (D) antes da indução (NI) e após a indução (I) com 300 mM de NaCl foram submetidos a SDS-PAGE 10% (A) ou 15% (B, C e D). As bandas indicadas correspondem às proteínas recombinantes. A migração do padrão de massa molecular (PM – em kDa) está indicada na coluna 1 de cada uma das figuras.

Após a análise da expressão inicial das proteínas PspARx1, Frag1, Frag2, Frag3, Frag4, Frag5, Frag6 e Frag7 (Apêndice C), os cultivos foram preparados em maior volume e o sobrenadante do lisado submetido à cromatografia em resina quelante de Ni^{+2} . Frações de todas as etapas da purificação foram coletadas. Após a purificação, todas as frações de lavagens e as eluições foram analisadas por SDS-PAGE 10% (PspARx1) ou 15% (Frag5) para a visualização da fração na qual a proteína se encontrava. Em seguida, essas frações que continham as proteínas recombinantes foram misturadas e dialisadas. A Figura 29 mostra as proteínas recombinantes após a diálise. As massas moleculares e pls preditos das proteínas são mostrados na Tabela 15. Pode-se notar que todos os fragmentos apresentam migração em SDS-PAGE acima do predito, principalmente os Frags 6 e 7, o que se deve provavelmente à presença de repetições de prolina nessas proteínas.

Tabela 15 - Massa molecular e o valor de pI preditos do PspARx1 e dos Frags.

Proteínas	Massa Molecular (kDa)	pI
PspARx1	43,1	5,1
Frag1	11,6	6,3
Frag2	12,0	6,3
Frag3	12,2	5,8
Frag4	12,1	5,0
Frag5	11,9	5,1
Frag6	11,7	5,3
Frag7	9,7	6,0

(A)

(B)

Figura 29 - Análise por SDS-PAGE do PspARx1 e dos Frags purificados e dialisados. (A) A proteína PspARx1 foi purificada e analisada por SDS-PAGE 10%. (B) Os fragmentos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 foram purificados e analisados por SDS-PAGE 15%. PM indica o padrão de massa molecular em kDa.

4.5.3 Análise por ELISA da indução de anticorpos anti-PspARx1 e anti-Frags em camundongos

Camundongos BALB/c foram imunizados com as proteínas recombinantes PspARx1, Frag1, Frag2, Frag3, Frag4, Frag5, Frag6 ou Frag7, seguindo-se o mesmo regime utilizado na imunização para a obtenção dos soros anti-PspAs, anti-PspC3 e anti-PspAN-terminal. Os soros foram coletados em *pool* e a análise da indução de anticorpos por ELISA indicou a concentração de IgG anti-PspA indicada na tabela 16.

Tabela 16 - Concentração de IgG anti-PspA obtida após imunização de camundongos BALB/c com as proteínas PspARx1, Frag1, Frag2, Frag3, Frag4, Frag5, Frag6 ou Frag7.

Proteína	Concentração de IgG em µg/mL
PspARx1	5785
Frag1	684
Frag2	554
Frag3	304
Frag4	2897
Frag5	1363
Frag6	80
Frag7	64

4.5.4 Ensaio funcional de ligação dos anticorpos anti-PspARx1 e anti-Frags à superfície do pneumococo

Para avaliar a capacidade de ligação dos anticorpos anti-Frags à superfície do pneumococo, foi realizado um ensaio funcional utilizando-se a linhagem D39, que é a cepa capsulada parental da Rx1 (Figura 30).

Figura 30 - Ensaio de ligação dos anticorpos anti-PspARx1 e anti-Frags à cepa D39 (PspA2). Os anticorpos contidos no soro de animais imunizados com PspARx1 ou com os Frags foram testados quanto à capacidade de ligarem-se à superfície do pneumococo. As bactérias foram incubadas com 1% de soro. O soro dos animais injetados apenas com Alum foi utilizado como controle (área cinza escuro). A mediana da fluorescência das bactérias está indicada dentro dos parênteses em cada amostra.

A figura 30 indica que os anticorpos anti-Frag3 (α -F3), anti-Frag6 (α -F6) e anti-Frag7 (α -F7) não foram capazes de se ligar à superfície do pneumococo. Os anticorpos anti-Frag1 (α -F1) se ligaram com intensidade moderada à superfície do pneumococo. Os anticorpos anti-Frag2 (α -F2), anti-Frag4 (α -F4), anti-Frag5 (α -F5) e anti-PspARx1 (α -PspARx1) ligaram-se com mais intensidade à superfície do pneumococo. Esses dados foram obtidos em experimentos com 1% de soro e resultados semelhantes foram observados quando a quantidade de soro foi acertada para concentrações equivalentes de IgG anti-PspA (dados não mostrados).

4.5.5 Avaliação por immunoblotting do reconhecimento dos fragmentos pelos MAb

Para avaliação de qual dos fragmentos cada um dos MAb seria capaz de reconhecer, foi realizado um *immunoblotting*, utilizando-se 10 μ g/mL de cada um dos MAb (Figura 31).

Figura 31 - Análise por *immunoblotting* do reconhecimento dos Frags e do PspARx1 pelos diferentes MAb. Reatividade dos MAb 1B2.21 (A), 8B2.19 (B), Rx1MI-003 (C), Rx1MI-005 (D), Rx1MI-006 (E), Rx1MI-007 (F), 1A4.7 (G) e 6A5.12 (H) com a molécula inteira PspARx1 e com os Frags do PspARx1 (F1, F2, F3, F4, F5, F6, e F7). O padrão de massa molecular (em kDa) está indicado à esquerda de cada uma das figuras.

É possível observar que os MAbs 1B2.21, 8B2.19, Rx1MI-005 e Rx1MI-006 foram capazes de reconhecer apenas o fragmento 2, além da molécula PspARx1 inteira, sendo o reconhecimento pelos MAbs 1B2.21 e 8B2.19 de menor intensidade. O MAb RX1MI-003 foi capaz de reconhecer apenas o fragmento 4, além da molécula PspARx1 inteira. Já o MAb Rx1MI-007 foi capaz de reconhecer apenas a molécula PspARx1 inteira, não tendo sido capaz de reconhecer qualquer um dos fragmentos.

Já os MAbs 1A4.7 e 6A5.12, produzidos contra a região rica em prolinas do PspA1 da cepa AC094, foram capazes de reconhecer apenas o fragmento 7, que contém a região rica em prolinas (incluindo o bloco NonPro). A molécula inteira PspARx1 não foi reconhecida por estes MAbs porque na clonagem da mesma não foi incluída a região de prolinas completa, faltando a região NonPro e o segundo bloco de prolinas (Figura 26 e Apêndice C). Esses dados estão de acordo com o reconhecimento exatamente da região NonPro nos *peptide arrays*. O MAb 5C4.7 também foi avaliado, mas nenhuma banda foi reconhecida. Esse MAb havia reconhecido a região de prolinas nos *peptide arrays*, o que indica que o reconhecimento desses epitopos em *immunoblotting* não é muito eficiente.

4.5.6 Análise por ELISA do reconhecimento dos fragmentos pelos MAbs

Para confirmação do resultado obtido no *immunoblotting*, foi realizada uma análise por ELISA do reconhecimento dos fragmentos pelos MAbs (Figura 32).

Figura 32 - Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags pelos MAbs. A diluição inicial de MAbs utilizada foi de 2 µg/mL. Foram utilizados os valores de densidade óptica (492 nm) da diluição contendo 0,125 µg/mL dos MAbs 1B2.21, 8B2.19, RX1MI-003, RX1MI-005, RX1MI-006 e RX1MI-007 e da diluição contendo 0,5 µg/mL dos MAbs 1A4.7, 5C4.7 e 6A5.12.

Os dados indicados na figura 32 confirmam os resultados obtidos no *immunoblotting*, com reatividade dos MAbs Rx1MI-005 e Rx1MI-006 com o fragmento 2, do MAb Rx1MI-003 com o fragmento 4 e sem reconhecimento de qualquer fragmento pelo MAb Rx1MI-007. Entretanto, o MAb 1B2.21, que havia reconhecido fracamente o fragmento 2 por *immunoblotting*, reconheceu o fragmento 4 por ELISA. Já o MAb 8B2.19, que havia reconhecido fracamente o fragmento 2 por *immunoblotting*, não reconheceu nenhum dos fragmentos por ELISA. Quanto aos MAbs produzidos contra a região de prolinas, os MAbs 1A4.7 e 6A5.12 novamente reconheceram apenas o fragmento 7, entretanto, o MAb 5C4.7 que não havia reconhecido qualquer fragmento no *immunoblotting* reconheceu também o fragmento 7 por ELISA.

4.5.7 Desafio de sobrevivência de camundongos imunizados com PspARx1 e seus fragmentos

Para avaliar a capacidade protetora da imunização com as proteínas PspARx1, Frag1, Frag2, Frag3, Frag4, Frag5, Frag6 ou Frag7, os camundongos

BALB/c imunizados com as proteínas recombinantes foram então desafiados com a linhagem de pneumococo A66.1, quinze dias após a última imunização, e a sobrevivência acompanhada por 10 dias. A tabela 17 indica a sobrevivência obtida para cada grupo imunizado. Os grupos imunizados com a PspARx1+Alum, Frag1+Alum, Frag2+Alum, Frag4+Alum e Frag5+Alum foram capazes de apresentar sobrevivência estatisticamente diferente do grupo controle Alum.

Tabela 17 - Sobrevivência de camundongos BALB/c imunizados com as proteínas PspARx1, Frag1, Frag2, Frag3, Frag4, Frag5, Frag6 ou Frag7 após desafio intranasal letal com a cepa A66.1.

Antígeno	Vivos / Total	Sobrevivência
Alum	0 / 12	0%
PspARx1+Alum	12 / 12	100%*
Frag1+Alum	11 / 12	92%*
Frag2+Alum	8 / 12	67%*
Frag3+Alum	0 / 12	0%
Frag4+Alum	11 / 11	100%*
Frag5+Alum	11 / 11	100%*
Frag6+Alum	0 / 12	0%
Frag7+Alum	0 / 11	0%

* Sobrevivência estatisticamente diferente do grupo controle Alum (Teste Exato de Fisher).

4.6 Avaliação de indução de anticorpos anti-PspA e anti-PspC em humanos

4.6.1 Ensaios de imunodeteção com soros de voluntários humanos da Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM) utilizando os peptide arrays

Visando analisar como se dá o reconhecimento de peptídeos lineares de PspA e PspC por soros de humanos, foram utilizados o primeiro grupo de *peptide*

arrays, contendo as sequências dos PspAs 1, 3, 4 e 5 (para o coorte B) e o segundo grupo de *peptide arrays*, contendo as sequências do PspA2 da cepa 371/00, do PspA2 da cepa Rx1, do PspA1 do sorotipo 6B utilizado nos desafios de colonização dos voluntários, e do PspC3 da cepa 491/00 (para os coortes A e B).

Inicialmente, para avaliar possíveis ligações inespecíficas do anticorpo comercial anti-IgG de humano aos peptídeos contidos nos *peptide arrays*, foi realizado um ensaio de imunodeteção sem utilizar qualquer soro de voluntário, sendo usado somente o anticorpo comercial (Figura 33 A e B). Os resultados obtidos mostram não haver qualquer reação inespecífica nos dois grupos de *peptide arrays*.

(A)

(B)

Figura 33 - Ensaio de imunodeteção realizados com o primeiro grupo (A) e segundo grupo (B) de *peptide arrays*, incubados somente com anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina (diluição 1:5000).

Após a confirmação de que não há reação inespecífica do anticorpo comercial, deu-se início aos ensaios utilizando o soro dos voluntários pertencentes ao coorte A (Figura 34 A-H), os quais não apresentavam colonização natural por pneumococo no momento do recrutamento (T0), foram desafiados e colonizados experimentalmente com pneumococo (sorotipo 6B) e sofreram um redesafio com o mesmo sorotipo 6B, aproximadamente um ano após o primeiro desafio (T2), tendo

sido 100% protegidos contra esse segundo evento de colonização. Para a avaliação desse coorte foi utilizado o segundo grupo de *peptide arrays*.

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

(F)

(G)

(H)

Figura 34 - Ensaio de imunodeteção realizado com os soros dos voluntários do coorte A. Foram utilizados aproximadamente 10 µg/mL de IgG anti-PspA1 do sorotipo 6B contidos nos soros dos voluntários. *Peptide array* após incubação com soro coletado em T0 (A) e T2 (B) do voluntário 122/108. *Peptide array* após incubação com soro coletado em T0 (C) e T2 (D) do voluntário 177/137. *Peptide array* após incubação com soro coletado em T0 (E) e T2 (F) do voluntário 188/04. *Peptide array* após incubação com soro coletado em T0 (G) e T2 (H) do voluntário 193/08. O anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000.

O ensaio de imunodeteccção realizado com o soro do voluntário 122/108 mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 18. Os mesmos *spots* foram reconhecidos em T0 e T2 que estão, em maioria, localizados na região rica em prolinas tanto na molécula PspA2 como na PspC3.

Tabela 18 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 122/108 em T0 e T2 no segundo grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
G1	P-E-A-P-A-P-A-P-A-P-K-P-A-P-A	PspA2
I2	A-E-E-E-A-K-R-K-A-D-A-K-E-Q-D	PspC3
I7/I8	V-P-G-E-L-A-T-P-D-K-K	PspC3
J21/J22	Q-P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P	PspC3
K1/K2/K3	P-A-P-A-P-K-P-E-K-P	PspC3

O ensaio de imunodeteccção realizado com o soro do voluntário 177/137 mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 19. Os mesmos *spots* foram reconhecidos em T0 e T2. Este soro foi capaz de reconhecer apenas dois peptídeos na sequência do PspA2, sendo um deles localizado na região rica em prolinas, um único peptídeo na sequência do PspA1 do sorotipo 6B (PspA6B) e todos os outros peptídeos estão localizados na sequência PspC3. Nos peptídeos reconhecidos no PspC3, destacam-se aqueles que apresentam a região indicada em azul, que é a responsável pela ligação de slgA ao PspC.

Tabela 19 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 177/137 em T0 e T2 no segundo grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
F3/F4	T-K-K-A-K-L-L-K-L-E-E	PspA2
G1	P-E-A-P-A-P-A-P-A-P-K-P-A-P-A	PspA2
H6/H7	A-Q-K-E-E-D-R-R-N-Y-P	PspC3
H23	T-R-L-E-N-I-K-T-D-R-K-K-A-E-E	PspC3
I6	S-K-R-R-T-K-R-A-V-P-G-E-L-A-T	PspC3
I11/I12/I13	S-V-G-E-E-T-L	PspC3
I21	K-A-Q-K-E-E-D-R-R-N-Y-P-S-N-T	PspC3
J17/J18/J19	E-D-K-V-K-E-K	PspC3
L15/L16/L17	E-A-K-Q-K-L-D	PspA6B

As sequências destacadas em azul são os sítios de ligação de sIgA no PspC3.

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do voluntário 188/04 mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 20. Os mesmos *spots* foram reconhecidos em T0 e T2. Este soro foi capaz de reconhecer dois peptídeos na sequência do PspARx1, um único peptídeo na sequência do PspA2, um único peptídeo na sequência do PspA6B e todos os outros peptídeos estão localizados na sequência PspC3. Nos peptídeos reconhecidos em PspC3, destacam-se aqueles que apresentam a região indicada em azul, que é a região responsável pela ligação de sIgA ao PspC, e aqueles que estão localizados dentro da região rica em prolínas.

Tabela 20 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 188/04 em T0 e T2 no segundo grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A24	K-D-A-A-D-K-M-I-D-E-A-K-K-R-E	PspARx1
C19	E-G-L-E-K-T-I-A-A-K-K-A-E-L-E	PspARx1
D6/D7	K-K-A-E-A-A-Q-R-K-Y-D	PspA2
H6/H7/H8/H9	R-R-N-Y-P-T	PspC3
H21/H22	K-A-E-A-T-R-L-N-I-K	PspC3
I11/I12/I13	S-V-G-E-E-T-L	PspC3
I20/I21	K-A-Q-K-E-E-D-R-R-N-Y-P	PspC3
J12	K-K-A-V-A-T-R-L-E-N-I-K-T-D-R	PspC3
J20/J21	A-E-Q-P-Q-P-A-P-A-P-Q	PspC3
K1/K2/K3	P-A-P-A-P-K-P-E-K-P	PspC3
K8/K9	A-K-R-D-A-E-N-A-K-K-A	PspA6B

As sequências destacadas em azul são os sítios de ligação de sIgA no PspC3.

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do voluntário 193/08 mostrou reatividade nos *spots* indicados nas tabelas 21 (T0) e 22 (T2). Quatro *spots* foram reconhecidos em T0 e T2, um único *spot* foi reconhecido exclusivamente em T0 e três *spots* foram reconhecidos exclusivamente em T2. Dos peptídeos reconhecidos tanto em T0 como em T2, apenas um único foi reconhecido na sequência do PspARx1, um único também na sequência do PspA2, sendo este na região rica em prolinas, e dois na sequência do PspC3, sendo ambos também localizados na região rica em prolinas. O peptídeo exclusivo de T0 foi reconhecido na sequência do PspA6B e os exclusivos de T2 foram reconhecidos nas sequências dos PspARx1, PspA2 e PspA6B, sendo estes peptídeos semelhantes.

Tabela 21 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 193/08 em T0 no segundo grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A22	Q-Q-A-T-D-K-A-A-K-D-A-A-D-K-M	PspARX1
G1	P-E-A-P-A-P-A-P-A-P-K-P-A-P-A	PspA2
J21/J22/J23	A-P-Q-P-E-K-P	PspC3
K1/K2/K3	P-A-P-A-P-K-P-E-K-P	PspC3
L20	E-V-A-L-Q-A-K-I-A-E-L-E-N-Q-V	PspA6B

O peptídeo destacado em fundo cinza foi reconhecido exclusivamente em T0.

Tabela 22 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 193/08 em T2 no segundo grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A22	Q-Q-A-T-D-K-A-A-K-D-A-A-D-K-M	PspARX1
G1	P-E-A-P-A-P-A-P-A-P-K-P-A-P-A	PspA2
J21/J22/J23	A-P-Q-P-E-K-P	PspC3
K1/K2/K3	P-A-P-A-P-K-P-E-K-P	PspC3
A10	K-A-L-D-D-A-K-A-A-Q-K-K-Y-D	PspARx1
D15	A-A-N-L-K-Y-Q-L-K-L-R-E-Y-L-K	PspA2
K20	K-A-N-L-Q-Y-Q-L-K-L-R-E-Y-I-Q	PspA6B

Os peptídeos destacados em fundo cinza foram reconhecidos exclusivamente em T2.

Em seguida, foram iniciados os ensaios utilizando o soro de alguns dos voluntários pertencentes ao coorte B (Figura 35 A-F), os quais apresentavam colonização natural por pneumococo no momento do recrutamento (T0), não foram desafiados experimentalmente com pneumococo e sofreram um redesafio com o sorotipo 6B, aproximadamente um ano após o primeiro *screening* (T2). Esse coorte apresentou 50% de proteção contra esse segundo evento de colonização. Inicialmente, como não era sabido à qual PspA e PspC esses voluntários haviam sido expostos neste evento de colonização natural, foi feita a avaliação de apenas

alguns dos voluntários desse coorte, utilizando-se o segundo grupo de *peptide arrays*.

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

(F)

Figura 35 - Ensaio de imunodeteccção realizado com os soros dos voluntários do coorte B com o segundo grupo de *peptide arrays*. Foram utilizados aproximadamente 10 µg/mL de IgG anti-PspA1 do sorotipo 6B contidos nos soros dos voluntários. *Peptide array* após incubação com soro coletado em T0 (A) e T2 (B) do voluntário 237/53. *Peptide array* após incubação com soro coletado em T0 (C) e T2 (D) do voluntário 255/67. *Peptide array* após incubação com soro coletado em T0 (E) e T2 (F) do voluntário 323/134. O anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000.

O ensaio de imunodeteccção realizado com o soro do voluntário 237/53, que foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 23. Dois *spots* dentro da região rica em prolinas foram reconhecidos na sequência do PspC3, tanto em T0 como em T2. Apenas um *spot* na sequência do PspA2 foi reconhecido exclusivamente em T2.

Tabela 23 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 237/53 em T0 e T2 no segundo grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
J20/J21/J22	A-E-Q-P-Q-P-A-P-A-P-Q	PspC3
K1/K2/K3	P-A-P-A-P-K-P	PspC3
D17	K-L-R-E-Y-L-K-Y-I-Q-E-K-N-K-E	PspA2

O peptídeo destacado em fundo cinza foi reconhecido exclusivamente em T2.

O ensaio de imunodeteccção realizado com o soro do voluntário 255/67, que não foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 24. A maioria dos *spots* foi reconhecida na sequência do PspC3 e apenas um *spot* em PspA2 e um *spot* em PspA6B foram reconhecidos, tanto em T0 como em

T2. Dois *spots* foram reconhecidos exclusivamente em T0, um na região rica em prolinas do PspA2 e um na sequência do PspC3.

Tabela 24 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 255/67 em T0 e T2 no segundo grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
E12	K-Q-K-V-D-A-A-K-Q-K-V-D-A-E-H	PspA2
G21/G22	L-D-A-A-F-K-Q-F-K-K-D	PspC3
H1/H2	P-E-K-K-V-A-E-A-Q-K-K	PspC3
H9/H10/H11	T-L-E-L-E-I-A	PspC3
H21/H22/H23	T-R-L-E-N-I-K	PspC3
I11/I12/I13	S-V-G-E-E-T-L	PspC3
I16/I17	K-V-A-E-A-E-K-K-V-E-E	PspC3
J1/J2	L-E-I-S-E-S-D-V-E-V-K	PspC3
J7/J8	P-R-N-E-E-K-V-K-Q-A-K	PspC3
J17/J18/J19	E-D-K-V-K-E-K	PspC3
J21/J22/J23	A-E-Q-P-Q-P-A-P-A-P-Q	PspC3
K1/K2/K3	P-A-P-A-P-K-P	PspC3
K17/K18	K-Q-A-S-E-A-E-Q-K-A-N	PspA6B
F24/G1	P-E-A-P-A-P-A-P-A-P-K	PspA2
I6	S-K-R-R-T-K-R-A-V-P-G-E-L-A-T	PspC3

Os peptídeos destacados em fundo cinza foram reconhecidos exclusivamente em T0.

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do voluntário 323/134, que foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 25. Os mesmos *spots* foram reconhecidos em T0 e T2. Apenas dois *spots* foram reconhecidos no PspA2, sendo um deles localizado na região rica em prolinas. Todos os outros *spots* foram reconhecidos no PspC3, destacando-se aqueles

reconhecidos na região rica em prolinas e aqueles que contêm a região de ligação de slgA.

Tabela 25 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 323/134 em T0 e T2 no segundo grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
E12	K-Q-K-V-D-A-A-K-Q-K-V-D-A-E-H	PspA2
F24/G1	P-E-A-P-A-P-A-P-A-P-K	PspA2
H6/H7/H8/H9	R-R-N-Y-P-T	PspC3
I7/I8	V-P-G-E-L-A-T-P-D-K-K	PspC3
I11/I12/I13	S-V-G-E-E-T-L	PspC3
I20	E-K-K-A-Q-K-E-E-D-R-R-N-Y	PspC3
J20/J21/J22	A-E-Q-P-Q-P-A-P-A-P-Q	PspC3
J24/K1	E-E-P-E-N-P-A-P-A-P-K	PspC3
K3	P-A-P-A-P-K-P-E-K-P-A-E-Q-P-Q	PspC3

As sequências destacadas em azul são os sítios de ligação de slgA no PspC3.

Posteriormente, foi feita então a avaliação de todos os voluntários do coorte B, utilizando-se o primeiro grupo de *peptide arrays* contendo as sequências dos PspAs 1, 3, 4 e 5, havendo agora uma maior chance de reconhecimento, já que cada um dos voluntários pode ter sido exposto a PspAs diferentes (Figura 36 A-H). Foram utilizados apenas os soros coletados em T0, uma vez que os ensaios anteriores mostraram não haver muita diferença entre os *spots* reconhecidos em T0 e T2.

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

(F)

(G)

(H)

Figura 36 - Ensaio de imunodeteção realizado com os soros dos voluntários do coorte B com o primeiro grupo de *peptide arrays*. Foram utilizados aproximadamente 10 µg/mL de IgG anti-PspA1 do sorotipo 6B contidos nos soros dos voluntários. *Peptide array* após incubação com soro coletado em T0 dos voluntários 208/23 (A), 237/53 (B), 238/54 (C), 255/67 (D), 292/105 (E), 294/107 (F), 323/134 (G) e 347/158 (H). O anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000.

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do voluntário 208/23, que foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 26. O soro deste voluntário foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs sintetizados neste grupo de *peptide arrays*, especialmente *spots* contendo sequências pertencentes à região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 26 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 208/23 em T0 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A17/A18	K-Y-Q-Q-E-L-V-K-Y-I-R	PspA1
B18	A-P-Q-A-K-I-A-E-L-E-H-E-V-Q-K	PspA1
C23/C24	P-A-E-E-T-P-A-P-A-P-K	PspA1
D2/D3/D4	E-Q-P-K-P-A-P	PspA1
F8	D-P-D-D-G-T-E-V-I-E-A-K-L-N-K	PspA3
G17/G18/G19	P-A-P-A-P-K-P	PspA3
K16/K17/K18	P-E-K-P-A-P-A	PspA4
P4	E-E-T-P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P-A-S	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do voluntário 237/53, que foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 27. O soro deste voluntário foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs, com exceção do PspA5. A maioria dos *spots* reconhecidos contém sequências pertencentes à região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 27 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 237/53 em T0 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
D2	A-P-K-P-E-Q-P-A-E-Q-P-K-P-A-P	PspA1
D4	E-Q-P-K-P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A	PspA1
E21/E22	E-V-E-A-K-E-L-E-I-E-K	PspA3
G18/G19	P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P-A	PspA3
K16/K17	P-A-P-Q-P-E-K-P-A-P-A	PspA4

O ensaio de imunodeteccção realizado com o soro do voluntário 238/54, que não foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 28. Assim como o voluntário 237/53, o soro do voluntário 238/54 foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs, com exceção do PspA5. A maioria dos *spots* reconhecidos contém sequências pertencentes à região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 28 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 238/54 em T0 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
D1/D2/D3	E-Q-P-A-E-Q-P	PspA1
G17/G18	Q-P-E-Q-P-A-P-A-P-K	PspA3
K16/K17	P-A-P-Q-P-E-K-P-A-P-A	PspA4
K23/K24	A-R-R-S-E-E-E-Y-N-R-L	PspA4
L1/L2/L3	Q-Q-Q-P-P-K-A	PspA4

O ensaio de imunodeteccção realizado com o soro do voluntário 255/67, que não foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 29. O soro deste voluntário foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs, especialmente *spots* contendo sequências pertencentes à região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 29 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 255/67 em T0 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
C23/C24	P-A-E-E-T-P-A-P-A-P-K	PspA1
D3/D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P	PspA1
G17/G18	Q-P-E-Q-P-A-P-A-P-K-P	PspA3
K15/K16/K17	P-A-P-Q-P-E-K	PspA4
K23	E-E-D-Y-A-R-R-S-E-E-E-Y-N-R-L	PspA4
L3	Q-Q-Q-P-P-K-A-E-K-P-A-P-A-S-A	PspA4
N7	G-I-A-P-Y-Q-N-K-V-A-E-L-N-K-E	PspA5
P3	D-G-D-E-E-E-T-P-A-P-A-P-K-P-E	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do voluntário 292/105, que não foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 30. Assim como o voluntário 255/67, o soro deste voluntário foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs, especialmente *spots* contendo sequências pertencentes à região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 30 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 292/105 em T0 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
C24	P-A-E-E-T-P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P	PspA1
D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A-E-E-P-E	PspA1
D17	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-G-Q-K	PspA3
G17/G18	Q-P-E-Q-P-A-P-A-P-K-P	PspA3
H4/H5/H6	K-K-A-E-D-A-Q	PspA4
K16/K17/K18	P-E-K-P-A-P-A	PspA4
L15	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-D-Q-K	PspA5
P3/P4	E-E-T-P-A-P-A-P-K-P-E	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do voluntário 294/107, que não foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 31. O soro deste voluntário foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs, especialmente *spots* contendo sequências pertencentes à região rica em prolinas e à região inicial N-terminal dessas moléculas.

Tabela 31 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 294/107 em T0 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A3	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA1
C23/C24	P-A-E-E-T-P-A-P-A-P-K	PspA1
D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A	PspA1
D10	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA3
G17/G18	Q-P-E-Q-P-A-P-A-P-K-P	PspA3
G23	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-M-K	PspA4
H21	K-Q-L-A-E-I-D-E-E-I-N-K-A-K-Q	PspA4
K15/K16/K17	P-A-P-Q-P-E-K	PspA4
L8	A-N-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do voluntário 323/134, que foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 32. O soro deste voluntário foi capaz de reconhecer inúmeros *spots* nas sequências de todos os PspAs. Os *spots* reconhecidos contêm sequências de diferentes regiões das moléculas.

Tabela 32 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 323/134 em T0 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A4	K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K-K-Y-E-A	PspA1
A10	A-A-Q-K-K-Y-E-D-D-Q-K-K-T-E-E	PspA1
C18	L-V-A-K-K-A-E-L-E-K-T-E-A-D-L	PspA1
C23	E-P-E-K-P-A-E-E-T-P-A-P-A-P-K	PspA1
D3/D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P	PspA1

D11	K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K-K-S-E-A	PspA3
D16	E-E-V-K-K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D	PspA3
E21	L-A-K-K-E-V-E-A-K-E-L-E-I-E-K	PspA3
F9	G-T-E-V-I-E-A-K-L-N-K-G-E-A-E	PspA3
F16	E-L-E-K-L-L-D-S-L-D-P-E-G-K-T	PspA3
G11	E-K-T-Q-K-E-L-D-A-A-L-N-E-L-G	PspA3
G16/G17/G18	Q-P-E-Q-P-A-P	PspA3
G24	K-A-E-K-D-Y-D-A-A-M-K-K-S-E-A	PspA4
H10	T-E-E-K-A-R-K-A-E-E-A-S-K-E-I	PspA4
I1	L-N-E-K-N-E-D-F-K-K-V-R-E-E-V	PspA4
I14	A-K-S-K-V-E-A-E-E-A-E-L-D-N-K	PspA4
I20	D-L-E-K-E-I-A-N-A-E-K-T-V-A-D	PspA4
J1	A-K-L-E-K-D-V-E-D-F-K-N-S-N-G	PspA4
J13	E-L-E-K-A-E-A-E-L-E-N-L-L-S-T	PspA4
K11	K-T-Q-K-E-L-D-A-A-L-N-E-L-G-P	PspA4
K15/K16/K17	P-A-P-Q-P-E-K	PspA4
K21/K22	D-Q-Q-A-E-E-D-Y-A-R-R	PspA4
L5	K-A-E-K-P-A-P-A-S-A-P-Q-P-S-R	PspA4
L9	K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K-K-S-E-A	PspA5
M20	E-V-A-K-E-K-Y-D-K-A-V-Q-E-V-E	PspA5
N6	D-L-E-K-G-I-A-P-Y-Q-N-K-V-A-E	PspA5
N15	D-Y-I-K-E-G-L-E-Q-A-I-A-D-K-K	PspA5
O7	N-I-E-A-L-Q-N-K-V-A-D-L-E-N-K	PspA5
P4/P5/P6	A-P-K-P-E-Q-P-A-S	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do voluntário 347/158, que foi recolonizado após o redesafio, mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 33. O soro deste voluntário foi capaz de reconhecer um único *spot* nas sequências de todos os PspAs, com exceção do PspA5. Os três *spots* reconhecidos contêm sequências da região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 33 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do voluntário 347/158 em T0 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A	PspA1
G16/G17/G18	Q-P-E-Q-P-A-P	PspA3
K16/K17/K18	P-E-K-P-A-P-A	PspA4

4.6.2 Ensaios de imunodeteção com soros de pacientes humanos hospitalizados da Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM) utilizando *peptide arrays*

Além dos ensaios com os voluntários dos coortes A e B, foram realizados experimentos com pacientes hospitalizados com doença do trato respiratório inferior (Figura 37 A-I) e pacientes hospitalizados com outros tipos de doenças (pacientes controle) (Figura 38 A-G). O soro dos pacientes com doença respiratória foi utilizado com o intuito de se comparar a resposta aos peptídeos lineares de pessoas possivelmente suscetíveis à doença pneumocócica com aquelas não suscetíveis (voluntários e pacientes controle). Como não se tinha conhecimento de a qual PspA esses pacientes estavam expostos, foi utilizado o primeiro grupo de *peptide arrays* para essa avaliação.

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

(F)

(G)

(H)

(I)

Figura 37 - Ensaio de imunodeteção realizado com os soros dos pacientes com doença do trato respiratório inferior utilizando o primeiro grupo de *peptide arrays*. Foram utilizados aproximadamente 10 µg/mL de IgG anti-PspA1 do sorotipo 6B contidos nos soros dos pacientes. *Peptide array* após incubação com soro dos pacientes 9386 (A), 10003 (B), 10004 (C), 10008 (D), 10011 (E), 10012 (F), 10018 (G), 10019 (H) e 10023 (I). O anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000.

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente 9386 (sexo feminino, 41 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 34. O soro deste paciente foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os

PspAs. Os *spots* reconhecidos contêm, basicamente, peptídeos localizados na região inicial N-terminal e na região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 34 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 9386 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A2/A3	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y	PspA1
B19	K-I-A-E-L-E-H-E-V-Q-K-L-E-K-A	PspA1
C23	E-P-E-K-P-A-E-E-T-P-A-P-A-P-K	PspA1
D5/D6	P-Q-P-E-K-P-A-E-E-P-E	PspA1
D9/D10	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA3
G16/G17	A-P-A-P-Q-P-E-Q-P-A-P	PspA3
G22/G23	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA4
I22	A-E-K-T-V-A-D-L-E-K-E-V-A-K-L	PspA4
K16/K17	P-A-P-Q-P-E-K-P-A-P-A	PspA4
L7/L8	A-N-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente 10003 (sexo feminino, 45 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 35. Assim como o paciente 9386, o soro deste paciente foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs. Os *spots* reconhecidos contêm, basicamente, peptídeos localizados na região inicial N-terminal e na região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 35 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10003 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A3	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA1
C22/C23/C24	P-A-E-E-T-P-A	PspA1
D3/D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P	PspA1
D10	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA3
G16/G17/G18	Q-P-E-Q-P-A-P	PspA3
G22/G23	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA4
K16/K17/K18	P-E-K-P-A-P-A	PspA4
K23/K24	A-R-R-S-E-E-E-Y-N-R-L	PspA4
L3	Q-Q-Q-P-P-K-A-E-K-P-A-P-A-S-A	PspA4
L8	A-N-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente 10004 (sexo masculino, 75 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 36. Assim como os pacientes 9386 e 10003, o soro deste paciente foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs. Os *spots* reconhecidos contêm, basicamente, peptídeos localizados na região inicial N-terminal e na região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 36 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10004 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A10/A11	K-Y-E-D-D-Q-K-K-T-E-E	PspA1
A21	N-D-P-T-K-K-A-E-A-K-K-A-M-D-E	PspA1
B14	V-T-E-A-K-Q-K-V-D-A-E-H-A-E-E	PspA1
C23/C24/D1	T-P-A-P-A-P-K	PspA1
D6	P-Q-P-E-K-P-A-E-E-P-E-N-P-A-S	PspA1
E22	E-V-E-A-K-E-L-E-I-E-K-L-Q-Y-E	PspA3
G16/G17/G18	Q-P-E-Q-P-A-P	PspA3
L4	P-K-A-E-K-P-A-P-A-S-A-P-Q-P-S	PspA4
L17	K-Y-D-E-D-Q-K-K-T-E-E-K-A-E-L	PspA5
M18	A-E-E-A-K-K-E-A-E-V-A-K-E-K-Y	PspA5
P3/P4	E-E-T-P-A-P-A-P-K-P-E	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente 10008 (sexo feminino, 35 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 37. O soro deste paciente foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs. A maioria dos *spots* reconhecidos contém peptídeos localizados na região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 37 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10008 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
C24/D1	T-P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P	PspA1
G18	Q-P-E-Q-P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P-A	PspA3
K18/K19	A-P-A-P-A-P-K-P-E-K-S	PspA4
K21/K22	D-Q-Q-A-E-E-D-Y-A-R-R	PspA4
P3/P4	E-E-T-P-A-P-A-P-K-P-E	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente 10011 (sexo feminino, 41 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 38. O soro deste paciente foi capaz de reconhecer *spots* apenas nas sequências dos PspAs 1 e 4 e todos eles contêm peptídeos localizados na região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 38 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10011 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A	PspA1
K16	E-T-P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A-P-A	PspA4
L2/L3	Q-Q-Q-P-P-K-A-E-K-P-A	PspA4

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente 10012 (sexo feminino, 78 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 39. O soro deste paciente foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs e todos eles contêm peptídeos localizados na região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 39 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10012 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
C24/D1	T-P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P	PspA1
G18/G19	P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P-A	PspA3
K17/K18	P-E-K-P-A-P-A-P-A-P-K	PspA4
P4/P5	A-P-A-P-K-P-E-Q-P-A-S	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente 10018 (sexo masculino, 86 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 40. O soro deste paciente foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs. A maioria dos *spots* reconhecidos contém peptídeos localizados na região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 40 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10018 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
B12	K-V-E-E-A-E-K-K-V-T-E-A-K-Q-K	PspA1
C21/C22	K-A-V-N-E-P-E-K-P-A-E	PspA1
D3/D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P	PspA1
G17/G18/G19	P-A-P-A-P-K-P	PspA3
K17/K18	P-E-K-P-A-P-A-P-A-P-K	PspA4
L1/L2	N-R-L-T-Q-Q-Q-P-P-K-A	PspA4
N18/N19	E-L-A-T-T-Q-Q-N-I-D-K	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente 10019 (sexo masculino, 77 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 41. O soro deste paciente foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os

PspAs. Muitos *spots* foram reconhecidos na sequência do PspA4 e grande parte dos *spots* foi reconhecida na região rica em prolinas das moléculas.

Tabela 41 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10019 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
C24/D1	T-P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P	PspA1
D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A	PspA1
G17/G18/G19	P-A-P-A-P-K-P	PspA3
H11/H12	E-E-A-S-K-E-I-A-K-A-T	PspA4
H21	K-Q-L-A-E-I-D-E-E-I-N-K-A-K-Q	PspA4
I22/I23	V-A-D-L-E-K-E-V-A-K-L	PspA4
K15/K16/K17	P-A-P-Q-P-E-K	PspA4
K23	E-E-D-Y-A-R-R-S-E-E-E-Y-N-R-L	PspA4
M11/M12	D-A-N-F-N-K-E-Q-A-K-V	PspA5
M21/M22	K-A-V-Q-E-V-E-V-E-K-N	PspA5
P3/P4	E-E-T-P-A-P-A-P-K-P-E	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente 10023 (sexo masculino, 75 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 42. O soro deste paciente foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs. Muitos *spots* foram reconhecidos em diferentes regiões das moléculas.

Tabela 42 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente 10023 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
B9	E-E-A-K-A-K-E-A-E-L-T-K-K-V-E	PspA1
B19	K-I-A-E-L-E-H-E-V-Q-K-L-E-K-A	PspA1
D5	P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A-E-E-P-E	PspA1
E17	E-K-V-A-K-R-K-Y-D-Y-A-T-L-K-V	PspA3
E22	E-V-E-A-K-E-L-E-I-E-K-L-Q-Y-E	PspA3
F8/F9	G-T-E-V-I-E-A-K-L-N-K	PspA3
F12/F13	N-A-K-Q-A-E-L-A-K-K-Q	PspA3
F19	G-K-T-Q-D-E-L-D-K-E-A-E-E-A-E	PspA3
G11	E-K-T-Q-K-E-L-D-A-A-L-N-E-L-G	PspA3
G19	P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P-A-Q-A-P-K	PspA3
J14	A-E-A-E-L-E-N-L-L-S-T-L-D-P-E	PspA4
J20	D-L-E-K-E-I-A-N-A-E-K-T-V-A-D	PspA4
J24	Q-V-A-E-L-E-E-E-L-S-K-L-E-D-N	PspA4
K17/K18	P-E-K-P-A-P-A-P-A-P-K	PspA4
L13	K-K-D-Y-E-T-A-K-K-K-A	PspA5
M5	S-R-K-K-S-D-A-K-K-K-L-D-D-A-S	PspA5
M9	H-I-E-E-V-K-L-K-Q-K-E-A-D-A-N	PspA5
O14	D-L-K-D-A-E-E-N-N-V-E-D-Y-V-K	PspA5
O17/O18/O19	A-L-T-D-K-K-V	PspA5

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

(F)

(G)

Figura 38 - Ensaio de imunodeteção realizado com soro dos pacientes controle com o primeiro grupo de *peptide arrays*. Foram utilizados aproximadamente 10 µg/mL de IgG anti-PspA1 do sorotipo 6B contidos nos soros dos pacientes controle. *Peptide array* após incubação com soro do controle dos indivíduos 10002 (A), 10006 (B), 10010 (C), 10013 (D), 10014 (E), 10016 (F) e 10020 (G). O anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000.

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente controle 10002 (sexo feminino, 65 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 43. O soro deste controle foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências dos PspAs 1, 3 e 4. Todos os *spots* foram reconhecidos na região rica em prolinas dessas moléculas.

Tabela 43 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10002 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A	PspA1
G17/G18	Q-P-E-Q-P-A-P-A-P-K-P	PspA3
K15/K16	E-T-P-A-P-A-P-Q-P-E-K	PspA4

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente controle 10006 (sexo masculino, 79 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 44. O soro deste controle foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências dos PspAs 1, 4 e 5. Os *spots* foram reconhecidos em diferentes regiões dessas moléculas e na região rica em prolínas dos PspAs 1 e 4. No PspA4 também foi reconhecida o bloco NonPro (K21/K22) da região de prolínas.

Tabela 44 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10006 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
C20	E-K-T-E-A-D-L-K-K-A-V-N-E-P-E	PspA1
D4	E-Q-P-K-P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A	PspA1
I19	N-K-V-A-D-L-E-K-E-I-A-N-A-E-K	PspA4
K16/K17	P-A-P-Q-P-E-K-P-A-P-A	PspA4
K21/K22	D-Q-Q-A-E-E-D-Y-A-R-R	PspA4
M23	E-V-E-V-E-K-N-K-I-L-E-Q-D-A-E	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente controle 10010 (sexo masculino, 64 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 45. O soro deste controle foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências dos PspAs 3, 4 e 5. Os *spots* foram reconhecidos em diferentes regiões dessas moléculas.

Tabela 45 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10010 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
D17	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-G-Q-K	PspA3
E14	E-T-K-K-K-A-E-E-A-K-A-E-E-K-V	PspA3
F15	K-K-Q-T-E-L-E-K-L-L-D-S-L-D-P	PspA3
G18/G19	P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P-A	PspA3
H6	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-G-Q-K	PspA4
I7	D-Q-R-K-A-E-E-A-K-A-E-E-K-V-A	PspA4
J24	Q-V-A-E-L-E-E-E-L-S-K-L-E-D-N	PspA4
K21	E-K-S-A-D-Q-Q-A-E-E-D-Y-A-R-R	PspA4
L15	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-D-Q-K	PspA5
L23	K-A-N-L-A-V-Q-E-A-Y-V-K-F-Q-E	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente controle 10013 (sexo feminino, 42 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 46. O soro deste controle foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs. Nos PspAs 3, 4 e 5, os *spots* foram reconhecidos apenas na região rica em prolinas. No PspA1, além da região de prolinas, foram reconhecidos dois *spots* em outras diferentes regiões da molécula.

Tabela 46 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10013 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
B24	E-S-D-S-E-D-Y-V-K-E-G-L-R-A-P	PspA1
C20	E-K-T-E-A-D-L-K-K-A-V-N-E-P-E	PspA1
D3/D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P	PspA1
G17/G18/G19	P-A-P-A-P-K-P	PspA3
K15/K16/K17	P-A-P-Q-P-E-K	PspA4
P4/P5	A-P-A-P-K-P-E-Q-P-A-S	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente controle 10014 (sexo masculino, 59 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 47. O soro deste controle foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs. Os *spots* foram reconhecidos em diferentes regiões das moléculas. A região rica em prolinas foi reconhecida apenas nos PspAs 1 e 3.

Tabela 47 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10014 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
C20	E-K-T-E-A-D-L-K-K-A-V-N-E-P-E	PspA1
C24	P-A-E-E-T-P-A-P-A-P-K-P-E-Q-P	PspA1
G18/G19/G20	P-A-P-K-P-E-Q-P-A	PspA3
H22	E-I-D-E-E-I-N-K-A-K-Q-I-L-N-E	PspA4
J3	D-F-K-N-S-N-G-E-Q-A-E-Q-Y-L-A	PspA4
O19	A-L-T-D-K-K-V-E-L-N-N-T-Q-K-A	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente controle 10016 (sexo feminino, 41 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 48. O soro deste controle foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs. A maioria dos *spots* foi reconhecida na região inicial N-terminal das diferentes moléculas. A região rica em prolinas foi reconhecida apenas nos PspAs 1 e 4.

Tabela 48 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10016 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A2	E-A-P-V-A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA1
D2/D3	E-Q-P-A-E-Q-P-K-P-A-P	PspA1
D9	E-A-P-V-A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA3
D17	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-G-Q-K	PspA3
F21	K-E-A-E-E-A-E-L-D-K-K-A-D-E-L	PspA3
G22	E-A-P-V-A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA4
H6	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-G-Q-K	PspA4
K4/K5/K6	E-D-Y-I-K-E-G	PspA4
K15/K16/K17	P-A-P-Q-P-E-K	PspA4
L7	E-A-P-V-A-N-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA5
L15	K-K-A-E-D-A-Q-K-K-Y-D-E-D-Q-K	PspA5

O ensaio de imunodeteção realizado com o soro do paciente controle 10020 (sexo feminino, 57 anos de idade) mostrou reatividade nos *spots* indicados na tabela 49. O soro deste controle foi capaz de reconhecer *spots* nas sequências de todos os PspAs. A maioria dos *spots* foi reconhecida na região inicial N-terminal e na região rica em prolinas das diferentes moléculas.

Tabela 49 - Peptídeos reconhecidos pelo soro do paciente controle 10020 no primeiro grupo de *peptide arrays*.

Localização do spot reconhecido no <i>peptide array</i>	Peptídeos reconhecidos	Molécula reconhecida
A3	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-V-K	PspA1
C24/D1/D2	A-P-K-P-E-Q-P	PspA1
D4/D5	P-A-P-A-P-Q-P-E-K-P-A	PspA1
D9/D10	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA3
G17/G18/G19	P-A-P-A-P-K-P	PspA3
G23	A-S-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D-A-A-M-K	PspA4
K15/K16	E-T-P-A-P-A-P-Q-P-E-K	PspA4
K17/K18	P-E-K-P-A-P-A-P-A-P-K	PspA4
L7/L8	A-N-Q-S-K-A-E-K-D-Y-D	PspA5
P4/P5/P6	A-P-K-P-E-Q-P-A-S	PspA5

4.6.3 Análise por ELISA do reconhecimento dos fragmentos do PspARx1 pelos soros dos voluntários e pacientes da Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM)

Visando avaliar a importância do reconhecimento das diferentes regiões de PspA pelos soros dos voluntários e dos pacientes, foram realizados ensaios de ELISA com esses soros contra os fragmentos de 100 aminoácidos do PspARx1. Como no caso da avaliação dos anticorpos monoclonais, esses ensaios avaliam tanto a presença de epitopos lineares contínuos, quanto epitopos conformacionais e não-contínuos na sequência linear da proteína.

Inicialmente os soros T0 e T2 do coorte A (N=10) foram testados para avaliação de algum reconhecimento diferencial dos fragmentos nos dois diferentes tempos (Figura 39).

Figura 39 - Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags (F1-F7) do PspARx1 pelos soros dos voluntários do coorte A. Foram utilizados aproximadamente 2 µg/mL de IgG anti-PspA1 do sorotipo 6B contidos nos soros dos voluntários nos poços da primeira diluição. A unidade arbitrária da ordenada indica o valor da densidade óptica obtida multiplicado pelo fator de diluição. O anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000. O * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

É possível observar diferença estatística significativa entre T0 e T2 nos fragmentos 2, 4 e 6. Este resultado indica que em T2, momento no qual os voluntários foram redesafiados e protegidos contra esse segundo evento de colonização, eles foram capazes de reconhecer melhor estas regiões da molécula.

Em seguida, foram realizados os ensaios com os soros do coorte B. Para a avaliação, os voluntários deste coorte foram agrupados em recolonizados (N=4) (Figura 40) ou não recolonizados (N=4) (Figura 41) após o redesafio com o sorotipo 6B.

Figura 40 - Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags (F1-F7) do PspARx1 pelos soros dos voluntários do coorte B recolonizados após redesafio. Foram utilizados aproximadamente 2 µg/mL de IgG anti-PspA1 do sorotipo 6B contidos nos soros dos voluntários na primeira diluição. A unidade arbitrária da ordenada indica o valor da densidade óptica obtida multiplicado pelo fator de diluição. O anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000. O * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$). O valor sobre as barras em F7 indica o valor de p .

Para os indivíduos recolonizados, é possível observar diferença estatística significativa entre T0 e T2 no fragmento 1. Um valor de p próximo a 0,05 foi observado no fragmento 7. Este resultado indica que em T0, momento no qual os voluntários estavam naturalmente colonizados, eles foram capazes de reconhecer melhor estas regiões da molécula.

Figura 41 - Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags (F1-F7) do PspARx1 pelos soros dos voluntários do coorte B não recolonizados após redesafio. Foram utilizados aproximadamente 2 µg/mL de IgG anti-PspA1 do sorotipo 6B contidos nos soros dos voluntários na primeira diluição. A unidade arbitrária da ordenada indica o valor da densidade óptica obtida multiplicado pelo fator de diluição. O anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000. Os valores sobre as barras em F1 e F7 indicam os valores de p .

Nos indivíduos não recolonizados, um valor de p próximo a 0,05 foi observado nos fragmentos 1 e 7. Este resultado indica que em T0, momento no qual os voluntários estavam naturalmente colonizados, eles foram capazes de reconhecer melhor estas regiões da molécula. Além disso, foi observado um maior reconhecimento de F2 no T2, momento no qual esses voluntários foram protegidos no redesafio com o sorotipo 6B.

Com o intuito de avaliar se os anticorpos contra os fragmentos teriam algum papel na proteção contra pneumonia, também foram avaliados e comparados os soros dos pacientes hospitalizados com doença respiratória do trato inferior com os soros de voluntários saudáveis, divididos por faixa etária em adultos (até 50 anos de idade) saudáveis (N=18) e doentes (N=4), e idosos doentes (com mais de 50 anos de idade) (N=7) (Figura 42).

Figura 42 - Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags (F1-F7) do PspARx1 pelos soros dos voluntários dos coortes A e B e dos pacientes hospitalizados com doença do trato respiratório inferior. Foram utilizados aproximadamente 2 µg/mL de IgG anti-PspA1 do sorotipo 6B contidos nos soros dos voluntários e pacientes na primeira diluição. A unidade arbitrária da ordenada indica o valor da densidade óptica obtida multiplicado pelo fator de diluição. O anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000. O * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$). O valor sobre as barras em F2 indica o valor de p .

Foi observado que, comparado ao grupo de adultos saudáveis, os adultos doentes apresentaram diferença estatística de IgG contra os fragmentos 1 e 3.

O grupo de idosos doentes apresentou uma resposta de IgG mais baixa para o fragmentos 2, quando comparado ao grupo dos adultos doentes ($p < 0,05$) e adultos saudáveis ($p = 0,06$).

Fazendo uma análise por faixa etária, considerando apenas adultos saudáveis (voluntários dos coortes A e B) (N=18) ou idosos saudáveis (pacientes controle sem doença do trato respiratório inferior) (N=8), é possível observar que há uma diferença estatística de reconhecimento dos fragmentos 2 e 7 (Figura 43). Os idosos reconheceram muito menos essas regiões da molécula.

Figura 43 - Análise por ELISA do reconhecimento dos Frags (F1-F7) do PspARx1 pelos soros dos adultos e idosos saudáveis. Foram utilizados, na primeira diluição, aproximadamente 2 µg/mL de IgG anti-PspA1 do sorotipo 6B contidos nos soros dos adultos saudáveis (T0 dos voluntários dos coortes A e B) e dos idosos saudáveis (pacientes controle, com mais de 50 anos, sem doença do trato respiratório inferior). A unidade arbitrária da ordenada indica o valor da densidade óptica obtida multiplicado pelo fator de diluição. O anticorpo comercial anti-IgG de humano conjugado à fosfatase alcalina foi utilizado em uma diluição 1:5000. O * indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

Vetores pAE-6xHis contendo os fragmentos gênicos das diferentes variantes de *pspA* e *pspC3* foram utilizados para transformar células de *E. coli*, que foram cultivadas e induzidas para expressão das proteínas recombinantes. A proteína recombinante PspA4Pro já havia sido purificada em nosso laboratório. A análise dos cultivos por SDS-PAGE 10% revelou que todas as proteínas recombinantes foram expressas e que as bandas observadas no gel apresentavam massa molecular acima do predito, como já havia sido descrito na literatura (Yother, Briles, 1992). Após a purificação das proteínas recombinantes, as mesmas foram utilizadas para imunização de camundongos e obtenção de soro. Os anticorpos anti-PspAs e anti-PspC3 contidos nos soros foram dosados por ELISA e em seguida estes soros foram utilizados em experimentos utilizando o primeiro grupo de *peptide arrays*.

Os resultados obtidos nos ensaios de imunodeteção utilizando *peptide arrays* mostraram que o soro anti-PspA2 foi o que reconheceu o menor número de peptídeos, estando estes localizados principalmente na região não conservada entre os PspAs. De fato, nosso grupo já havia demonstrado que o PspA2 é a pior molécula na proteção conferida após desafio intranasal invasivo com bactérias expressando PspAs heterólogos (Moreno et al., 2010). O soro anti-PspA3 foi aquele capaz de reconhecer o maior número de peptídeos, entretanto, a maioria deles foi reconhecida na sequência do próprio PspA3.

Os soros anti-PspA4 e anti-PspA5, que foram capazes de apresentar maior reatividade cruzada em ensaios de *immunoblotting* (Darrieux et al., 2008), não mostraram o reconhecimento de peptídeos exclusivos para estes soros. Entretanto, eles indicaram um padrão de reconhecimento semelhante, havendo, de maneira geral, uma reatividade positiva com peptídeos localizados na região N-terminal (especialmente no primeiro terço dessa região) dos PspAs homólogos (PspA4 ou PspA5) e heterólogos (PspA1, PspA2, PspA3 e PspA4 ou PspA5) e, reconhecimento de somente poucos peptídeos nas outras regiões da molécula homóloga. A interação positiva com os epitopos nessa região conservada deve ser responsável pela maior capacidade de reconhecimento de moléculas heterólogas pelos soros anti-PspA4 e anti-PspA5. A importância dessa região N-terminal mais conservada

entre os PspAs está descrita na literatura. Roche e colaboradores (Roche et al., 2003) mostraram que a imunização de camundongos BALB/c com um fragmento compreendendo os aminoácidos de 1 a 115 da molécula de PspA da cepa EF3296 (PspA de clado 3) foi capaz de conferir proteção a estes animais, após desafio intravenoso com a própria cepa EF3296, apesar do baixo título de anticorpos detectado por ensaios de ELISA para esse fragmento. McDaniel e colaboradores (McDaniel et al., 1994) já haviam mapeado epitopos protetores nas regiões cobrindo os primeiros 115 aminoácidos na sequência do PspA da cepa Rx1, utilizando anticorpos monoclonais produzidos contra o mesmo PspA.

Além da região N-terminal, alguns trabalhos sugerem a importância da região rica em prolinas na proteção conferida após desafio letal com pneumococo. Brooks-Walter e colaboradores (Brooks-Walter et al., 1999) mostraram que a imunização com PspC contendo a região rica em prolinas protegeu camundongos desafiados com cepas de pneumococo que não possuíam o gene *pspC*. Essa proteção cruzada pode ter ocorrido pela reatividade dos anticorpos anti-PspC com a região de prolinas de PspA, já que a região de prolinas é muito parecida entre as duas moléculas, chegando a 80% de similaridade (Brooks-Walter et al., 1999; Iannelli et al., 2002; Yother, Briles, 1992). Essa observação foi confirmada pelo fato de anticorpos anti-PspC perderem a capacidade de ligação à PspA após a retirada da região de prolinas dessa molécula (Brooks-Walter et al., 1999). Daniels e colaboradores (Daniels et al., 2010) mostraram que tanto a região rica em prolinas como o bloco NonPro (sem prolinas) dessa região foram capazes de proteger camundongos após desafio intravenoso com pneumococo, entretanto o bloco NonPro é o mais imunogênico dessa região. De fato, é possível observar nos resultados obtidos com os *peptide arrays* o reconhecimento de um peptídeo no bloco NonPro da região rica em prolinas pelo soro anti-PspA4. Pode ser que o fato de os anticorpos anti-PspA4 reconhecerem o bloco NonPro potencialize a capacidade de reconhecimento cruzado desses anticorpos, o que está de acordo com os resultados apresentados por Darrieux e colaboradores, que apresenta os anticorpos anti-PspA4 como aqueles capazes de maior reconhecimento cruzado em experimentos de *immunoblotting* (Darrieux et al., 2008). Corroborando esses resultados, um trabalho do nosso grupo (Moreno et al., 2010) mostrou que a inserção do bloco NonPro na

sequência de um PspA de clado 3, originalmente não contendo essa região, foi capaz de aumentar consideravelmente o reconhecimento dos diferentes isolados de pneumococo por *immunoblotting* e também aumentar a capacidade de ligação dos anticorpos e mediação de deposição de C3 na superfície da bactéria testada que expressa PspA contendo a região NonPro.

Os ensaios de imunodeteção realizados com o soro anti-PspC3 de camundongos mostraram que este foi capaz de reconhecer principalmente peptídeos envolvidos na interação com Fator H (FH) e slgA humanos. Como essa interação entre PspC e FH e/ou slgA está envolvida no mecanismo de evasão da bactéria do sistema imune do hospedeiro, a obtenção de anticorpos que se liguem nas regiões de interação dessas moléculas com PspC deve ser importante no combate às infecções causadas por pneumococo. Resultados publicados por nosso grupo (Moreno et al., 2012) mostraram que, de fato, a pré incubação com IgG anti-PspC3 levou a uma relativa inibição da ligação de FH e a uma parcial inibição da ligação de slgA em experimentos de *immunoblotting*.

De acordo com esses resultados obtidos com os soros de camundongos nos ensaios de imunodeteção com os *peptide arrays*, decidimos sintetizar um gene capaz de expressar a região que se mostrou mais reativa para todos os soros anti-PspAs. A região de maior reconhecimento de peptídeos está localizada no primeiro terço da região N-terminal das moléculas de PspA, estando de acordo com os resultados apresentados por alguns trabalhos citados acima. Foi utilizado um gene sintético codificando 3 repetições dos primeiros 39 aminoácidos da sequência de PspA4, que é o PspA que apresenta maior reatividade cruzada. O gene nomeado *pspAN-terminal* foi subclonado a partir do vetor pUCamp-*pspAN-terminal* em vetor pAE e a proteína recombinante obtida (PspAN-terminal) foi utilizada para a imunização de camundongos. O soro desses animais foi coletado e testado em alguns ensaios para avaliarmos se o dobramento adquirido pela proteína PspAN-terminal permitiu a geração de anticorpos contra a região inicial N-terminal de interesse.

O ensaio de imunodeteção com o primeiro grupo de *peptide arrays* mostrou que o soro foi capaz de reconhecer epitopos localizados na região inicial N-terminal das diferentes variantes de PspA, confirmando que a proteína recombinante

produzida foi capaz de induzir anticorpos que reconhecem os peptídeos lineares que haviam sido selecionados como importantes. O soro anti-PspAN-terminal também foi testado por ELISA quanto à sua capacidade de reatividade cruzada com as variantes de PspA e com o próprio PspAN-terminal. Este soro foi capaz de reconhecer todos os PspAs testados, reagindo mais intensamente com os PspAs 3, 4 e 4Pro. Este resultado indica que, além de ser capaz de reconhecer epitopos da região inicial N-terminal das variantes do PspA, o soro anti-PspAN-terminal é capaz de reconhecer as moléculas inteiras dessas variantes. Entretanto, quando testados por citometria de fluxo, os anticorpos anti-PspAN-terminal não foram capazes de se ligar à superfície do pneumococo (tanto à cepa ATCC6303 – PspA5, quanto à cepa 3JY2670 – PspA4). Como a porção N-terminal do PspA forma um *coiled-coil*, ou seja, tem forma de uma haste alongada que provém de hélices espiraladas antiparalelas (Jedrzejewski et al., 2001), pode ser que essa região inicial N-terminal tenha ficado camuflada na espessa cápsula polissacarídica presente nas cepas utilizadas, já que estas pertencem ao sorotipo 3, que é um dos que apresentam cápsula mais espessa. Outra possibilidade seria que anticorpos contra epitopos lineares não se ligariam eficientemente à PspA nativa na superfície do pneumococo.

Para testar então a capacidade protetora do PspAN-terminal, os camundongos imunizados com essa molécula foram posteriormente desafiados por via intranasal com a cepa ATCC6303, que expressa PspA do clado 5. Esses animais foram acompanhados por 10 dias, quando foi constatado que nenhum animal foi capaz de sobreviver ao desafio. Novamente, esse resultado poderia ser explicado pela possibilidade da região inicial N-terminal ter sido mascarada pela espessa cápsula polissacarídica, impedindo o reconhecimento pelo sistema imune. Além disso, pode ser que os anticorpos que reconhecem epitopos lineares de PspA não sejam efetivamente protetores. É possível que epitopos conformacionais, que não podem ser avaliados pelos *peptide arrays*, sejam os determinantes da proteção mediada por anticorpos anti-PspA.

Na tentativa de elucidar a relevância da região inicial N-terminal do PspA, realizamos experimentos utilizando alguns anticorpos monoclonais (MAbs) enviados gentilmente pelo Dr. David E. Briles. O primeiro grupo de MAbs utilizado foi produzido em camundongos contra o PspA da cepa Rx1 (que expressa PspA2).

Inicialmente, esses MAbs foram testados em ensaios com o segundo grupo de *peptide arrays* (contendo a sequência do PspARx1) e nenhum deles foi capaz de reconhecer qualquer *spot*. Este resultado nos levou a acreditar na hipótese de que esses monoclonais reconheceriam epítopos conformacionais não contínuos na sequência linear da proteína. Ou seja, os epítopos não estariam nos peptídeos de 15 aminoácidos dos *peptide arrays*, mas sim presentes em fragmentos maiores com uma estrutura tridimensional semelhante àquela da proteína nativa, como indicou o resultado negativo obtido no desafio com pneumococo após imunização com a proteína PspAN-terminal, indicando que peptídeos lineares de fato parecem não ser protetores.

O segundo grupo de MAbs utilizado foi produzido contra a região rica em prolinas do PspA1 da cepa AC094 e esses MAbs foram testados em ensaios com o primeiro grupo de *peptide arrays*. Os resultados indicaram o reconhecimento de alguns peptídeos na região rica em prolinas das diferentes variantes de PspA, como esperado. Entretanto, destaca-se o peptídeo localizado dentro do bloco NonPro da região de prolinas da molécula PspA4, reconhecido por dois dos três MAbs (1A4.7 e 6A5.12). O reconhecimento deste peptídeo no bloco NonPro vai de encontro aos resultados já apresentados obtidos com o soro anti-PspA4 nos ensaios de imunodeteção com os *peptide arrays*, reforçando a sugestão de alguns trabalhos citados anteriormente, de que esse bloco NonPro parece estar relacionado a algum tipo de proteção conferida pelo antígeno PspA e até mesmo à potencialização da reatividade cruzada da molécula PspA4.

Dessa forma, decidimos construir fragmentos de 100 aminoácidos (com exceção de Frag 7 que possui 81 aminoácidos), com uma sobreposição de 50 aminoácidos, da molécula PspARx1. Esses fragmentos (Frag 1-7) foram clonados, expressos e purificados e então utilizados em um ensaio de *immunoblotting* para a análise do reconhecimento dos mesmos pelos MAbs. A maioria dos MAbs reconheceu o fragmento 2, que compreende os aminoácidos 79-178, correspondendo ao segundo terço da região N-terminal de PspA. Apenas um MAb (Rx1MI-003) foi capaz de reconhecer o fragmento 4, que compreende os aminoácidos 179-278, contemplando metade de região definidora de clado (CDR). O reconhecimento desses fragmentos pelos MAbs, testados por ELISA, confirmaram

os resultados obtidos no *immunoblotting*, com reatividade dos MAbs Rx1MI-005 e Rx1MI-006 com o fragmento 2, do MAb Rx1MI-003 com o fragmento 4 e sem reconhecimento de qualquer fragmento pelo MAb Rx1MI-007. Entretanto, o MAb 1B2.21, que havia reconhecido fracamente o fragmento 2 por *immunoblotting*, reconheceu o fragmento 4 por ELISA. Já o MAb 8B2.19, que havia reconhecido fracamente o fragmento 2 por *immunoblotting*, não reconheceu nenhum dos fragmentos por ELISA. Essas pequenas discrepâncias de resultado podem ter ocorrido pelas diferenças de sensibilidade das técnicas e possíveis alterações de estrutura na proteína em SDS-PAGE.

Esses MAbs cedidos pelo Dr. David E. Briles também foram utilizados pelo seu grupo para avaliação da capacidade de promover opsonofagocitose do pneumococo (cepa A66.1; PspA2 – sorotipo 3) e de oferecerem proteção passiva de camundongos após desafio com a mesma cepa A66.1 (Genschmer et al., 2013; Genschmer et al., manuscrito em preparação). Os resultados obtidos nestes trabalhos indicaram que todos os MAbs foram capazes de mediar opsonofagocitose do pneumococo, com exceção dos MAbs Rx1MI-005 e Rx1MI-006. Entretanto, o MAb Rx1MI-007 promoveu uma taxa menor de morte em relação aos MAbs 1B2.21, 8B2.19 e Rx1-MI003. Os resultados de proteção mostraram que os únicos MAbs que não foram capazes de proteger passivamente os camundongos foram aqueles que não mediarão opsonofagocitose (Rx1MI-005 e Rx1MI-006). O MAb Rx1MI-007 promoveu uma proteção passiva intermediária. Esses resultados parecem indicar que os MAbs que reconheceram o fragmento 4 foram os mais efetivos em proteger os camundongos após o desafio. Entretanto, o MAb que reconheceu fracamente o fragmento 2 no *immunoblotting* (8B2.19) também foi capaz de promover proteção, assim como o MAb 1B2.21, sobre o qual não houve um consenso em relação ao reconhecimento dos fragmentos 2 e/ou 4. Esse resultado pode ser efeito da especificidade da região CDR, já que o fragmento 4 contém essa região da molécula e a cepa utilizada no desafio (A66.1) expressa PspA do clado 2, o mesmo pertencente ao PspA da cepa Rx1, à partir da qual os fragmentos foram clonados. Além disso, o grupo do Dr Briles também demonstrou que o MAb 1A4.7, que reconhece a região NonPro, é capaz de mediar opsonofagocitose em níveis

intermediários e de proteger camundongos contra desafio com A66.1 (Genschmer et al., manuscrito em preparação).

Para tentar avaliar a capacidade de interação dos anticorpos anti-Frags com a superfície da bactéria, realizamos experimentos de citometria de fluxo com o soro de animais imunizados com os fragmentos recombinantes, utilizando a cepa D39 de pneumococo, que é a cepa parental encapsulada da cepa Rx1. Os anti-Frags 3, 6 e 7 não foram capazes de se ligar à superfície da bactéria, enquanto os anti-Frags 1, 2, 4 e 5 foram capazes de se ligar, sendo que o anti-Frag 1 se ligou mais fracamente. Assim, os fragmentos 2 e 4, que foram reconhecidos pelos MAbs, parecem estar expostos o suficiente na superfície do pneumococo para serem reconhecidos e podem, de fato, ser importantes na proteção conferida por PspA. Por outro lado, os fragmentos 6 e 7, que correspondem à região rica em prolinas, parecem não estar expostos na superfície da bactéria. O fragmento 3 parece também não estar exposto, provavelmente por uma questão de conformação molecular, já que PspA forma um *coiled-coil*, como citado anteriormente.

Corroborando os resultados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo, o experimento de desafio com a cepa A66.1, dos camundongos imunizados com os fragmentos do PspA da cepa Rx1, mostrou que os fragmentos 1, 2, 4 e 5 foram aqueles capazes de conferir proteção. De fato, as regiões dos fragmentos 3, 6 e 7 parecem não estar expostas o suficiente na molécula para interagir com o sistema imune e, assim, promover proteção contra o pneumococo.

Visando analisar o padrão de reconhecimento de epitopos lineares (por meio do uso de *peptide arrays*) e conformacionais (por ELISA) de PspA por soros humanos, na tentativa de correlacionar com os resultados de camundongos, testamos os soros de voluntários participantes de um modelo de colonização experimental com pneumococo (sorotipo 6B – PspA1) e de pacientes hospitalizados com doença respiratória do trato inferior, além de pacientes controle internados com outros tipos de doença. Esses voluntários e pacientes faziam parte de estudos realizados pelo grupo de Infecções Respiratórias da *Liverpool School of Tropical Medicine (LSTM)*.

Os resultados obtidos com os *peptide arrays* indicaram que os soros dos voluntários (coorte A e coorte B) e pacientes (com ou sem doença do trato

respiratório inferior) reconheceram peptídeos localizados em diferentes regiões do PspA mas, principalmente, na região inicial N-terminal, assim como em camundongos, e na região rica em prolinas. A região rica em prolinas não foi muito reconhecida nos ensaios realizados com soros de camundongos. Melin e colaboradores (Melin et al., 2012) destacaram a presença de anticorpos contra a região rica em prolinas em crianças que haviam sido colonizadas por pneumococo. O reconhecimento frequente dessa região pelos soros humanos pode estar relacionado à exposição repetida a pneumococos e também ao fato de outros microorganismos comensais e/ou patógenos apresentarem uma região rica em prolinas em algumas de suas moléculas de superfície, permitindo, assim, reatividade cruzada. Wells e colaboradores (Wells et al., 2004) identificaram, utilizando anticorpos monoclonais, epitopos na região de prolinas de antígenos de superfície de *Pneumocystis carinii*, um fungo patogênico oportunista que causa pneumonia em hospedeiros imunocomprometidos, e encontraram epitopos semelhantes na mesma região da molécula de PspA. A proteína M6 de *Streptococcus pyogenes* (Hollingshead et al., 1986) e a proteína A de *Staphylococcus aureus* (Guss et al., 1984) também apresentam região rica em prolinas. Assim como em PspA, essas regiões se localizam próximo à parte C-terminal das moléculas. Uma molécula de superfície, denominada P1, de *Streptococcus mutans*, que é o principal causador das cáries dentárias, também apresenta região de prolinas. Brady e colaboradores analisaram a importância dessa região em P1 e concluíram que ela é relevante para a conformação da molécula e para sua expressão na superfície do *S. mutans* (Brady et al., 1998).

De modo geral, os mesmos peptídeos foram reconhecidos pelos soros do mesmo indivíduo em T0 e em T2, indicando que o desafio e o evento de colonização não alteraram o reconhecimento de epitopos lineares por cada indivíduo. Também não foi possível identificar um peptídeo que pudesse ser utilizado como um marcador de proteção contra colonização, uma vez que não houve peptídeos específicos reconhecidos somente por voluntários não recolonizados após o redesafio. Além disso, pela avaliação dos pacientes, não foi possível observar que na ausência de reconhecimento de um determinado epitopo a pessoa estaria suscetível a adquirir pneumonia (no caso dos pacientes com doença do trato

respiratório inferior indicativo de pneumonia). Apesar de não termos observado epitopos lineares relacionados ao evento de colonização e, consecutivamente, à proteção contra recolonização, dados de Ferreira e colaboradores (Ferreira et al., 2013) mostraram que o evento de colonização foi capaz de aumentar, tanto na mucosa quanto no soro, os níveis de IgG anti-proteínas de pneumococo, dentre elas o PspA, e IgG anti-cápsula. Este trabalho mostrou também que a transferência passiva do soro dos voluntários após o evento de colonização foi capaz de conferir 70% de proteção em camundongos após desafio letal com uma cepa heteróloga (cepa D39). Essa observação parece confirmar que os epitopos lineares de PspA de fato não apresentam participação alguma na proteção conferida contra o pneumococo.

Nos ensaios de imunodeteção com os soros dos voluntários, realizados com o segundo grupo de *peptide arrays*, o qual contém peptídeos cobrindo a sequência do PspC3, foi possível observar que, assim como o soro de camundongos imunizados com PspC3, o soro de alguns voluntários foi capaz de reconhecer peptídeos contendo a região de interação com sIgA. Esse reconhecimento, entretanto, não está associado à proteção contra recolonização. Quanto ao reconhecimento da região de interação com FH, foi possível observar que nenhum dos voluntários foi capaz de reconhecer essa região. Como o soro de camundongos imunizados com PspC3 foi capaz de reconhecer essa região e não ocorre interação de PspC com FH murino, é possível que o FH se ligue imediatamente ao PspC quando a bactéria entra em contato com o plasma humano e essa interação mascare o reconhecimento desta região pelo sistema imune, facilitando a atuação do FH no processo de evasão do sistema imune pela bactéria. Alguns experimentos realizados por Ferreira e colaboradores parecem confirmar o exposto (Ferreira et al., manuscrito em preparação), mostrando que a cepa D39 de pneumococo, pré-tratada com IgG anti-PspC purificado de soros humanos, e em seguida incubada com FH, teve sua aderência à células epiteliais humanas apenas parcialmente bloqueada. O bloqueio total não foi observado provavelmente devido ao não reconhecimento da região de ligação do FH no PspC pelos anticorpos IgG anti-PspC.

Como os resultados obtidos com os *peptide arrays*, tanto com os soros dos voluntários como dos pacientes, não foram indicativos de epitopos lineares

envolvidos na proteção contra pneumococo, assim como o resultado obtido para camundongos, decidimos testar também o reconhecimento dos sete fragmentos do PspARx1 por esses soros, na tentativa de observar diferença de reconhecimento dos epítopos conformacionais. Por meio de ensaios de ELISA, utilizando os soros dos voluntários do coorte A, foi possível observar um aumento de IgG contra os fragmentos 2, 4 e 6 entre os tempos T0 e T2 ($p < 0,05$). O fragmento 2 compreende o segundo terço da região N-terminal do PspARx1 e os fragmentos 4 e 6 possuem parte da região definidora de clado (CDR). Este resultado parece indicar que estes fragmentos estão relacionados à proteção dos voluntários deste coorte contra recolonização após redesafio.

No caso do coorte B, tanto nos voluntários recolonizados como nos não recolonizados, foi possível observar uma redução de IgG anti-frag1 e anti-frag7 no T2 ($p < 0,05$ e $p = 0,0886$, respectivamente, para os recolonizados e $p = 0,0928$ e $p = 0,0541$, respectivamente, para os não-recolonizados). Este resultado indica que em T0, quando estes voluntários encontram-se naturalmente colonizados por pneumococo, há uma maior reconhecimento dessas regiões da molécula, o que parece estar relacionado simplesmente à exposição dessas pessoas à bactéria. Ou seja, essas regiões devem ser apenas marcadoras de exposição ao pneumococo. Este resultado parece ir de encontro aos resultados obtidos nos *peptide arrays*, onde foi possível notar um reconhecimento geral da região inicial N-terminal (compreendida no fragmento 1) e da região rica em prolínas (compreendida no fragmento 7). Como essas regiões são as mais conservadas na molécula, elas apresentam maior reatividade cruzada, aumentando o reconhecimento por soros de voluntários expostos a diferentes PspAs.

Comparando as respostas dos adultos saudáveis (coorte A + coorte B) com as dos adultos e idosos doentes, foi observado que os adultos doentes apresentaram aumento de IgG contra os fragmentos 1 e 3, quando comparados com os adultos saudáveis ($p < 0,05$). O aumento de IgG anti-Frag1 parece novamente estar relacionado à possível exposição das pessoas doentes à bactéria. Quanto à elevação de IgG anti-frag3, o resultado não fica claro, já que esta região parece estar escondida na molécula, como observado no resultado de citometria de fluxo apresentado na figura 29. Comparando os diferentes grupos etários, foi observado

que o grupo de idosos doentes apresentou uma resposta de IgG mais baixa para o fragmento 2, quando comparado ao grupo dos adultos doentes ($p<0,05$) e adultos saudáveis ($p=0,06$). Este resultado parece confirmar o resultado obtido com o coorte A, ou seja, o fragmento 2 parece, de fato, estar relacionado à proteção conferida contra o pneumococo. A falha no reconhecimento da região do fragmento 2 pode estar relacionada à maior suscetibilidade do grupo de idosos em adquirir doenças pneumocócicas.

Quando foi feita uma análise por faixa etária, considerando apenas pessoas saudáveis, foi possível observar que há uma diminuição no reconhecimento dos fragmentos 2 e 7 no grupo dos idosos ($p<0,05$). Novamente, os idosos responderam menos à região do fragmento 2 da molécula, confirmando os resultados anteriores. Com relação ao resultado obtido para o fragmento 7, sua importância na proteção contra o pneumococo parece não estar definida, já que os resultados obtidos com os *peptide arrays* indicam que esta região está relacionada à exposição à bactéria e, além disso, a região de prolinas parece estar escondida na superfície da bactéria, desfavorecendo sua apresentação ao sistema imune. Entretanto, pelo fato de o PspA não estar covalentemente ligado à superfície do pneumococo, pode ser que em alguns casos a molécula seja liberada e essa região fique exposta. Essa exposição também pode ocorrer quando o pneumococo entra na sua fase transparente, na qual a cápsula se encontra delgada a ponto de expor melhor suas proteínas de superfície. Além disso, algumas literaturas já citadas neste trabalho, indicam que esta é uma região importante na proteção conferida contra a bactéria. Além disso, os dados obtidos com MAb 1A4.7 pelo grupo do Dr Briles indicam que a região NonPro, presente no fragmento 7, pode contribuir para a proteção contra pneumococo.

Desse modo, este trabalho mostra que anticorpos contra epitopos lineares de PspA parecem ser induzidos contra a região inicial N-terminal e, principalmente, contra a região rica em prolinas. No entanto, os resultados obtidos indicam que esses anticorpos em humanos seriam apenas marcadores de exposição ao pneumococo e não seriam correlacionados com proteção. Essa conclusão é reforçada por experimentos em camundongos, em que não foi observada proteção contra desafio letal em animais imunizados com uma proteína contendo repetições

da região N-terminal de PspA, mesmo com a indução de anticorpos contra epitopos lineares dessa região. Por outro lado, os dados obtidos com anticorpos monoclonais e a análise dos fragmentos do PspARx1 indicaram que epitopos conformacionais são os que de fato parecem conferir proteção contra o pneumococo, especialmente aqueles que envolvem a região dos fragmentos 2 e 4. No entanto, o fragmento 4 é uma região menos conservada entre os diferentes clados de PspA, enquanto que o fragmento 2 compreende uma região um pouco mais conservada entre as famílias de PspA. Para determinação do peptídeo exato da molécula Frag2 que interage com os MAbs protetores e para o mapeamento dos epitopos conformacionais importantes desse fragmento, poderiam ser realizados experimentos de *Phage Display*. Em relação a PspC, epitopos lineares desse antígeno parecem ser importantes na região de ligação às moléculas sIgA e FH.

Portanto, uma vacina proteica de ampla cobertura, poderia conter a região do fragmento 2 do PspA4 (PspA que apresenta maior reatividade cruzada) e as regiões de ligação de sIgA e FH de PspC3 (que, da mesma forma que PspA4, apresenta maior reatividade cruzada). Os dados obtidos nesse trabalho podem, portanto, servir como base para o desenvolvimento de uma nova vacina proteica de ampla cobertura contendo múltiplos epitopos, capaz de induzir proteção sorotipo-independente contra infecções causadas por pneumococo.

REFERÊNCIAS*

Agarwal V, Asmat TM, Luo S, Jensch I, Zipfel PF, Hammerschmidt S. Complement regulator Factor H mediates a two-step uptake of *Streptococcus pneumoniae* by human cells. *J Biol Chem*. 2010;285:23486-95.

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.

Bergmann S, Lang A, Rohde M, Agarwal V, Rennemeier C, Grashoff C, Preissner KT, Hammerschmidt S. Integrin-linked kinase is required for vitronectin-mediated internalization of *Streptococcus pneumoniae* by host cells. *J Cell Sci*. 2009;122:256-67.

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.

Brady LJ, Cvitkovitch DG, Geric CM, Addison MN, Joyce JC, Crowley PJ, Bleiweis AS. Deletion of the central proline-rich repeat domain results in altered antigenicity and lack of surface expression of the *Streptococcus mutans* P1 adhesin molecule. *Infect Immun*. 1998;66:4274-82.

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.

* 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>

Brasil. Ministério da Saúde. Informações de saúde. [cited from 2013 jan 18]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>

Brasil. Ministério da Saúde. Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente no calendário básico de vacinação da criança . [cited from 2013 jun 16]. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/>

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.

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, Group SI. 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, Lamberts 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: Tuomanen E MT, 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.

Daniels CC, Coan P, King J, Hale J, Benton KA, Briles DE, Hollingshead SK. The proline-rich region of pneumococcal surface proteins A and C contains surface-accessible epitopes common to all pneumococci and elicits antibody-mediated protection against sepsis. *Infect Immun*. 2010;78:2163-72.

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 Moura J, Felicori L, Moreau V, Guimaraes G, Dias-Lopes C, Molina L, Alvarenga LM, Fernandes P, Frezard F, Ribeiro RR, Fleury C, Nguyen C, Molina F, Granier C, Chavez-Olortegui C. Protection against the toxic effects of *Loxosceles intermedia* spider venom elicited by mimotope peptides. *Vaccine*. 2011;29:7992-8001.

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.

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

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

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*. 2009;19:464-70.

Ferreira DM, Neill DR, Bangert M, Gritzfeld JF, Green N, Wright AK, Pennington SH, Bricio-Moreno L, 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;187:855-64.

Frank R. SPOT-synthesis - An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron*. 1992;48:9217-32.

Frank R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods*. 2002; 267:13-26.

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

Gavi Alliance. *Pneumococcal factsheet*. [cited from 2013 apr 24]. Disponível em: <http://www.gavialliance.org/support/nvs/pneumococcal/>

Genschmer KR, Accavitti-Loper MA, Briles DE. A modified surface killing assay (MSKA) as a functional in vitro assay for identifying protective antibodies against pneumococcal surface protein A (PspA). *Vaccine*. 2013;32:39-47.

Green MC, Mason EO, Kaplan SL, Lamberth LB, Stovall SH, Givner LB, Bradley JS, Tan TQ, Barson WJ, Hoffman JA, Lin PL, Hulten KG. Increase in prevalence of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6C at Eight Children's Hospitals in the United States from 1993 to 2009. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2097-2101.

Guss B, Uhlen M, Nilsson B, Lindberg M, Sjoquist J, Sjobahl J. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur J Biochem*. 1984;138:413-20.

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.

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.

Hilpert K, Winkler DF, Hancock RE. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nat Protoc.* 2007;2:1333-49.

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.

Hollingshead SK, Fischetti VA, Scott JR. Complete nucleotide sequence of type 6 M protein of the group A *Streptococcus*. Repetitive structure and membrane anchor. *J Biol Chem.* 1986;261:1677-86.

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.

Jedrzejewski MJ, Lamani E, Becker RS. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. *J Biol Chem*. 2001;276:33121-8.

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.

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.

Kolberg J, Aase A, Rodal G, Littlejohn JE, Jedrzejewski MJ. Epitope mapping of pneumococcal surface protein A of strain Rx1 using monoclonal antibodies and molecular structure modelling. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;39:265-73.

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.

Lima-Junior JC, Jiang J, Rodrigues-da-Silva RN, Banic DM, Tran TM, Ribeiro RY, Meyer VS, De-Simone SG, Santos F, Moreno A, Barnwell JW, Galinski MR, Oliveira-Ferreira J. B cell epitope mapping and characterization of naturally acquired antibodies to the *Plasmodium vivax* merozoite surface protein-3alpha (PvMSP-3alpha) in malaria exposed individuals from Brazilian Amazon. *Vaccine*. 2011;29:1801-11.

Lottersberger J, Guerrero SA, Tonarelli GG, Frank R, Tarabla H, Vanasco NB. Epitope mapping of pathogenic *Leptospira* LipL32. *Lett Appl Microbiol*. 2009;49:641-5.

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, Paula A, Almeida VV, 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;85:495-502.

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

Melin M, Coan P, Hollingshead S. Development of cross-reactive antibodies to the proline-rich region of pneumococcal surface protein A in children. *Vaccine*. 2012;30:7157-60.

Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. 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.

Moreno AT, Oliveira ML, Ho PL, Vadesilho CF, Palma GM, Ferreira JM, Jr., Ferreira DM, Santos SR, Martinez MB, Miyaji EN. Cross-reactivity of antipneumococcal 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;19:499-507.

Mott M, Caierao J, Rosa da Cunha G, Rodrigues Perez LR, Matusiak R, Pilger de Oliveira KR, d'Azevedo PA, Dias C. Susceptibility profiles and correlation with pneumococcal serotypes soon after implementation of the 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. *Int J Infect Dis*. 2013.

Nahm MH, Lin J, Finkelstein JA, Pelton SI. Increase in the prevalence of the newly discovered pneumococcal serotype 6C in the nasopharynx after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. *J Infect Dis*. 2009;199:320-5.

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*. 2007;75:350-7.

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.

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

Paterson GK, Mitchell TJ. The role of *Streptococcus pneumoniae* sortase A in colonisation and pathogenesis. *Microbes Infect*. 2006;8:145-53.

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.

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, 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.

Rennemeier C, Hammerschmidt S, Niemann S, Inamura S, Zahringer U, Kehrel BE. Thrombospondin-1 promotes cellular adherence of gram-positive pathogens via recognition of peptidoglycan. *FASEB J*. 2007;21:3118-32.

Roche H, Hakansson A, Hollingshead SK, Briles DE. Regions of PspA/EF3296 best able to elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* in a murine infection model. *Infect Immun*. 2003;71:1033-41.

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 EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Elsevier Inc.;. 1989.

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 [corrected]. *Infect Immun*. 2004;72:5031-40.

Singh R, Singh S, Sharma PK, Singh UP, Briles DE, Hollingshead SK, Lillard JW, Jr. Helper T cell epitope-mapping reveals MHC-peptide binding affinities that correlate with T helper cell responses to pneumococcal surface protein A. *PLoS One*. 2010;5:e9432.

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.

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.

Tocheva AS, Jefferies JM, Christodoulides M, Faust SN, Clarke SC. Increase in serotype 6C pneumococcal carriage, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:154-5.

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.

Voss S, Hallstrom 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;288:15614-27.

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

Wells J, Gigliotti F, Simpson-Haidaris PJ, Haidaris CG. Epitope mapping of a protective monoclonal antibody against *Pneumocystis carinii* with shared reactivity to *Streptococcus pneumoniae* surface antigen PspA. *Infect Immun*. 2004;72:1548-56.

Werno AM, Lewis JG, George PM, Murdoch DR. Immune reactivity of four monoclonal and two polyclonal antibodies raised against recombinant pneumococcal surface adhesin A. *Hybridoma (Larchmt)*. 2012;31:168-75

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.

WHO/Unicef *Joint Reporting Form on Immunization* - PCV_CMantel_VisionGlobal_ARG_Mar2012.pdf

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. p30-48.

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 - Sequências dos peptídeos sintetizados no primeiro grupo de *peptide arrays*

A 1	VRAEEAPVASQSKAE	seq. 01 PspA1
A 2	EAPVASQSKAEKDYD	seq. 02 PspA1
A 3	ASQSKAEKDYDAAVK	seq. 03 PspA1
A 4	KAEKDYDAAVKKYEA	seq. 04 PspA1
A 5	DYDAAVKKYEA AKKE	seq. 05 PspA1
A 6	AVKKYEA AKKEYEDG	seq. 06 PspA1
A 7	YEAAKKEYEDGKAAQ	seq. 07 PspA1
A 8	KKEYEDGKAAQKKYE	seq. 08 PspA1
A 9	EDGKAAQKKYEDDQK	seq. 09 PspA1
A10	AAQKKYEDDQKKTEE	seq. 10 PspA1
A11	KYEDDQKKTEEKAAE	seq. 11 PspA1
A12	DQKKTEEKAAEEERKA	seq. 12 PspA1
A13	TEEKAAEEERKASEEE	seq. 13 PspA1
A14	AAEEERKASEEEQAAN	seq. 14 PspA1
A15	RKASEEEQAANLKYQ	seq. 15 PspA1
A16	EEEAQANLKYQQELV	seq. 16 PspA1
A17	AANLKYQQELVKYIR	seq. 17 PspA1
A18	KYQQELVKYIRENDP	seq. 18 PspA1
A19	ELVKYIRENDPTKKA	seq. 19 PspA1
A20	YIRENDPTKKA EAKK	seq. 20 PspA1
A21	NDPTKKA EAKKAMDE	seq. 21 PspA1
A22	KKAEAKKAMDEAEKE	seq. 22 PspA1
A23	AKKAMDEAEKEYKKK	seq. 23 PspA1
A24	MDEAEKEYKKKQTEF	seq. 24 PspA1
B 1	EKEYKKKQTEFAEVR	seq. 25 PspA1
B 2	KKKQTEFAEVR AKVI	seq. 26 PspA1
B 3	TEFAEVR AKVIPSAE	seq. 27 PspA1
B 4	EVRAKVIPSAEELKK	seq. 28 PspA1
B 5	KVIPSAEELKKTRQK	seq. 29 PspA1
B 6	SAEELKKTRQKAEEA	seq. 30 PspA1
B 7	LKKTRQKAEEAKAKE	seq. 31 PspA1
B 8	RQKAEEAKAKEAELT	seq. 32 PspA1
B 9	EEAKAKEAELTKKVE	seq. 33 PspA1
B10	AKEAELTKKVEEAEK	seq. 34 PspA1
B11	ELTKKVEEAEKKVTE	seq. 35 PspA1
B12	KVEEA EKKVTEAKQK	seq. 36 PspA1
B13	AEKKVTEAKQKVDAE	seq. 37 PspA1
B14	VTEAKQKVDAEHAE	seq. 38 PspA1
B15	KQKVDAEHAEVAPQ	seq. 39 PspA1
B16	DAEHAEVAPQAKIA	seq. 40 PspA1
B17	AEVAPQAKIAELEH	seq. 41 PspA1
B18	APQAKIAELEHEVQK	seq. 42 PspA1
B19	KIAELEHEVQKLEKA	seq. 43 PspA1
B20	LEHEVQKLEKALKEI	seq. 44 PspA1

B21	VQKLEKALKEIDESD	seq. 45	PspA1
B22	EKALKEIDESDSEDY	seq. 46	PspA1
B23	KEIDESDSEDYVKEG	seq. 47	PspA1
B24	ESDSEDYVKEGLRAP	seq. 48	PspA1
C 1	EDYVKEGLRAPLQFE	seq. 49	PspA1
C 2	KEGLRAPLQFELDVK	seq. 50	PspA1
C 3	RAPLQFELDVKQAKL	seq. 51	PspA1
C 4	QFELDVKQAKLSKLE	seq. 52	PspA1
C 5	DVKQAKLSKLEELSD	seq. 53	PspA1
C 6	AKLSKLEELSDKIDE	seq. 54	PspA1
C 7	KLEELSDKIDELDAE	seq. 55	PspA1
C 8	LSDKIDELDAEIAKL	seq. 56	PspA1
C 9	IDELDAEIAKLEKDV	seq. 57	PspA1
C10	DAEIAKLEKDVEDFK	seq. 58	PspA1
C11	AKLEKDVEDFKNSDG	seq. 59	PspA1
C12	KDVEDFKNSDGEQAG	seq. 60	PspA1
C13	DFKNSDGEQAGQYLA	seq. 61	PspA1
C14	SDGEQAGQYLAAAE	seq. 62	PspA1
C15	QAGQYLAAAEEDLVA	seq. 63	PspA1
C16	YLAAAEEDLVAKKAE	seq. 64	PspA1
C17	AEEDLVAKKAELEKT	seq. 65	PspA1
C18	LVAKKAELEKTEADL	seq. 66	PspA1
C19	KAELEKTEADLKKAV	seq. 67	PspA1
C20	EKTEADLKKAVNEPE	seq. 68	PspA1
C21	ADLKKAVNEPEKPAE	seq. 69	PspA1
C22	KAVNEPEKPAEETPA	seq. 70	PspA1
C23	EPEKPAEETPAPAPK	seq. 71	PspA1
C24	PAEETPAPAPKPEQP	seq. 72	PspA1
D 1	TPAPAPKPEQPAEQP	seq. 73	PspA1
D 2	APKPEQPAEQPKPAP	seq. 74	PspA1
D 3	EQPAEQPKPAPAPQP	seq. 75	PspA1
D 4	EQPKPAPAPQPEKPA	seq. 76	PspA1
D 5	PAPAPQPEKPAEEPE	seq. 77	PspA1
D 6	PQPEKPAEEPENPAS	seq. 78	PspA1
D 7	KPAEEPENPASAPQP	seq. 79	PspA1
D 8	VRAEEAPVASQSKAE	seq. 80	PspA3
D 9	EAPVASQSKAEKDYD	seq. 81	PspA3
D10	ASQSKAEKDYDAAVK	seq. 82	PspA3
D11	KAEKDYDAAVKKSEA	seq. 83	PspA3
D12	DYDAAVKKSEAAKKH	seq. 84	PspA3
D13	AVKKSEAAKKHYEEV	seq. 85	PspA3
D14	SEAAKKHYEEVKKKA	seq. 86	PspA3
D15	KKHYEEVKKKAEDAQ	seq. 87	PspA3
D16	EEVKKKAEDAQKKYD	seq. 88	PspA3
D17	KKAEDAQKKYDEGQK	seq. 89	PspA3
D18	DAQKKYDEGQKKTVE	seq. 90	PspA3
D19	KYDEGQKKTVEKAKR	seq. 91	PspA3
D20	GQKKTVEKAKREKEA	seq. 92	PspA3
D21	TVEKAKREKEASEKI	seq. 93	PspA3
D22	AKREKEASEKIAEAT	seq. 94	PspA3
D23	KEASEKIAEATKEVQ	seq. 95	PspA3

D24	EKIAEATKEVQQASN	seq. 96 PspA3
E 1	EATKEVQQASNESQR	seq. 97 PspA3
E 2	EVQQASNESQRKEAD	seq. 98 PspA3
E 3	ASNESQRKEADKKIK	seq. 99 PspA3
E 4	SQRKEADKKIKEATQ	seq. 100 PspA3
E 5	EADKKIKEATQRKDE	seq. 101 PspA3
E 6	KIKEATQRKDEAEAA	seq. 102 PspA3
E 7	ATQRKDEAEAAFATI	seq. 103 PspA3
E 8	KDEAEAAFATIRTTI	seq. 104 PspA3
E 9	EAAFATIRTTIVVPE	seq. 105 PspA3
E10	ATIRTTIVVPEPSEL	seq. 106 PspA3
E11	TTIVVPEPSELAETK	seq. 107 PspA3
E12	VPEPSELAETKKKAE	seq. 108 PspA3
E13	SELAETKKKAEEAKA	seq. 109 PspA3
E14	ETKKKAEEAKAEEKV	seq. 110 PspA3
E15	KAEEAKAEEKVAKRK	seq. 111 PspA3
E16	AKAEEKVAKRKYDYA	seq. 112 PspA3
E17	EKVAKRKYDYATLKV	seq. 113 PspA3
E18	KRKYDYATLKVALAK	seq. 114 PspA3
E19	DYATLKVALAKKEVE	seq. 115 PspA3
E20	LKVALAKKEVEAKEL	seq. 116 PspA3
E21	LAKKEVEAKELEIEK	seq. 117 PspA3
E22	EVEAKELEIEKLQYE	seq. 118 PspA3
E23	KELEIEKLQYEISTL	seq. 119 PspA3
E24	IEKLQYEISTLEQEV	seq. 120 PspA3
F 1	QYEISTLEQEVATAQ	seq. 121 PspA3
F 2	STLEQEVATAQHQVD	seq. 122 PspA3
F 3	QEVATAQHQVDNLKK	seq. 123 PspA3
F 4	TAQHQVDNLKKLLAG	seq. 124 PspA3
F 5	QVDNLKKLLAGADPD	seq. 125 PspA3
F 6	LKKLLAGADPDGTE	seq. 126 PspA3
F 7	LAGADPDGTEVIEA	seq. 127 PspA3
F 8	DPDDGTEVIEAKLNK	seq. 128 PspA3
F 9	GTEVIEAKLNKGEAE	seq. 129 PspA3
F10	IEAKLNKGEAELNAK	seq. 130 PspA3
F11	LNKGEAELNAKQael	seq. 131 PspA3
F12	EAELNAKQaelAKKQ	seq. 132 PspA3
F13	NAKQaelAKKQTELE	seq. 133 PspA3
F14	AELAKKQTELEKLLD	seq. 134 PspA3
F15	KKQTELEKLLDSLDP	seq. 135 PspA3
F16	ELEKLLDSLDPegKT	seq. 136 PspA3
F17	LLDSLDPegKTQDEL	seq. 137 PspA3
F18	LDPEGKTQDELDKEA	seq. 138 PspA3
F19	GKTQDELDKEAEAE	seq. 139 PspA3
F20	DELDKEAEAEELDKK	seq. 140 PspA3
F21	KEAEAEELDKKADEL	seq. 141 PspA3
F22	EAELDKKADELQNKV	seq. 142 PspA3
F23	DKKADELQNKVADLE	seq. 143 PspA3
F24	DELQNKVADLEKEIS	seq. 144 PspA3
G 1	NKVADLEKEISNLEI	seq. 145 PspA3
G 2	DLEKEISNLEILLGG	seq. 146 PspA3

G 3	EISNLEILLGGADSE	seq. 147 PspA3
G 4	LEILLGGADSEDDTA	seq. 148 PspA3
G 5	LGGADSEDDTAALQN	seq. 149 PspA3
G 6	DSEDDTAALQNKLAT	seq. 150 PspA3
G 7	DTAALQNKLATKKAE	seq. 151 PspA3
G 8	LQNKLATKKAELEKT	seq. 152 PspA3
G 9	LATKKAELEKTQKEL	seq. 153 PspA3
G10	KAELEKTQKELDAAL	seq. 154 PspA3
G11	EKTQKELDAALNELG	seq. 155 PspA3
G12	KELDAALNELGPDGD	seq. 156 PspA3
G13	AALNELGPDGDEEET	seq. 157 PspA3
G14	ELGPDGDEEETPAPA	seq. 158 PspA3
G15	DGDEEETPAPAPQPE	seq. 159 PspA3
G16	EETPAPAPQPEQPAP	seq. 160 PspA3
G17	APAPQPEQPAPAPKP	seq. 161 PspA3
G18	QPEQPAPAPKPEQPA	seq. 162 PspA3
G19	PAPAPKPEQPAQAPK	seq. 163 PspA3
G20	PAPKPEQPAQAPKSR	seq. 164 PspA3
G21	VRAEEAPVASQSKAE	seq. 165 PspA4
G22	EAPVASQSKAEKDYD	seq. 166 PspA4
G23	ASQSKAEKDYDAAMK	seq. 167 PspA4
G24	KAEKDYDAAMKKSEA	seq. 168 PspA4
H 1	DYDAAMKKSEAAKKA	seq. 169 PspA4
H 2	AMKKSEAAKKAYEEA	seq. 170 PspA4
H 3	SEAAKKAYEEAKKKA	seq. 171 PspA4
H 4	KKAYEEAKKKAEDAQ	seq. 172 PspA4
H 5	EEAKKKAEDAQKKYD	seq. 173 PspA4
H 6	KKAEDAQKKYDEGQK	seq. 174 PspA4
H 7	DAQKKYDEGQKKTEE	seq. 175 PspA4
H 8	KYDEGQKKTEEKARK	seq. 176 PspA4
H 9	GQKKTEEKARKAEEA	seq. 177 PspA4
H10	TEEKARKAEEASKEI	seq. 178 PspA4
H11	ARKAEEASKEIAKAT	seq. 179 PspA4
H12	EEASKEIAKATSEVQ	seq. 180 PspA4
H13	KEIAKATSEVQNAYV	seq. 181 PspA4
H14	KATSEVQNAYVKYQR	seq. 182 PspA4
H15	EVQNAYVKYQRVQRN	seq. 183 PspA4
H16	AYVKYQRVQRNSRLN	seq. 184 PspA4
H17	YQRVQRNSRLNEKER	seq. 185 PspA4
H18	QRNSRLNEKERKKQL	seq. 186 PspA4
H19	RLNEKERKKQLAEID	seq. 187 PspA4
H20	KERKKQLAEIDEEIN	seq. 188 PspA4
H21	KQLAEIDEEINKAKQ	seq. 189 PspA4
H22	EIDEEINKAKQILNE	seq. 190 PspA4
H23	EINKAKQILNEKNED	seq. 191 PspA4
H24	AKQILNEKNEDFKKV	seq. 192 PspA4
I 1	LNEKNEDFKKVREEV	seq. 193 PspA4
I 2	NEDFKKVREEVIPEP	seq. 194 PspA4
I 3	KKVREEVIPEPTELA	seq. 195 PspA4
I 4	EEVIPEPTELAKDQR	seq. 196 PspA4
I 5	PEPTELAKDQRKAEE	seq. 197 PspA4

I 6	ELAKDQRKAEEAKAE	seq. 198 PspA4
I 7	DQRKAEEAKAEEKVA	seq. 199 PspA4
I 8	AEEAKAEEKVAKRKY	seq. 200 PspA4
I 9	KAEKVKAKRKYDYAT	seq. 201 PspA4
I10	KVAKRKYDYATLKVA	seq. 202 PspA4
I11	RKYDYATLKVALAKS	seq. 203 PspA4
I12	YATLKVALAKSKVEA	seq. 204 PspA4
I13	KVALAKSKVEAEAE	seq. 205 PspA4
I14	AKSKVEAEAEELDNK	seq. 206 PspA4
I15	VEAEAEELDNKAENL	seq. 207 PspA4
I16	EAELDNKAENLQNKV	seq. 208 PspA4
I17	DNKAENLQNKVADLE	seq. 209 PspA4
I18	ENLQNKVADLEKEIA	seq. 210 PspA4
I19	NKVADLEKEIANA EK	seq. 211 PspA4
I20	DLEKEIANA EKTVAD	seq. 212 PspA4
I21	EIANA EKTVADLEKE	seq. 213 PspA4
I22	AEKTVADLEKEVAKL	seq. 214 PspA4
I23	VADLEKEVAKLEKDV	seq. 215 PspA4
I24	EKEVAKLEKDVDFK	seq. 216 PspA4
J 1	AKLEKDVDFKNSNG	seq. 217 PspA4
J 2	KDVDFKNSNGEQAE	seq. 218 PspA4
J 3	DFKNSNGEQAEQYLA	seq. 219 PspA4
J 4	SNGEQAEQYLA AEK	seq. 220 PspA4
J 5	QAEQYLA AEKDLVA	seq. 221 PspA4
J 6	YLA AEKDLVAKKAE	seq. 222 PspA4
J 7	AEKDLVAKKAELAEA	seq. 223 PspA4
J 8	LVAKKAELAEAKIKA	seq. 224 PspA4
J 9	KAELAEAKIKAATKK	seq. 225 PspA4
J10	AEAKIKAATKKAELE	seq. 226 PspA4
J11	IKAATKKAELEKAEA	seq. 227 PspA4
J12	TKKAELEKAEAELEN	seq. 228 PspA4
J13	ELEKAEAELENLLST	seq. 229 PspA4
J14	AEAELENLLSTLDPE	seq. 230 PspA4
J15	LENLLSTLDPEGKTQ	seq. 231 PspA4
J16	LSTLDPEGKTQDELD	seq. 232 PspA4
J17	DPEGKTQDELDKEAA	seq. 233 PspA4
J18	KTQDELDKEAAEAELE	seq. 234 PspA4
J19	ELDKEAAEAELENKKV	seq. 235 PspA4
J20	EAAEAELENKKVEALQ	seq. 236 PspA4
J21	AELNKKVEALQNQVA	seq. 237 PspA4
J22	KKVEALQNQVAELEE	seq. 238 PspA4
J23	ALQNQVAELEEELSK	seq. 239 PspA4
J24	QVAELEEELSKLEDN	seq. 240 PspA4
K 1	LEEELSKLEDNFKDA	seq. 241 PspA4
K 2	LSKLEDNFKDAETNN	seq. 242 PspA4
K 3	EDNFKDAETNNVEDY	seq. 243 PspA4
K 4	KDAETNNVEDYIKEG	seq. 244 PspA4
K 5	TNNVEDYIKEGLEEA	seq. 245 PspA4
K 6	EDYIKEGLEEAIATK	seq. 246 PspA4
K 7	KEGLEEAIATKKAEL	seq. 247 PspA4
K 8	EEAIATKKAELEKTQ	seq. 248 PspA4

K 9	ATKKAELEKTQKELD	seq. 249 PspA4
K10	AELEKTQKELDAALN	seq. 250 PspA4
K11	KTQKELDAALNELGP	seq. 251 PspA4
K12	ELDAALNELGPDGDE	seq. 252 PspA4
K13	ALNELGPDGDEEETP	seq. 253 PspA4
K14	LGPDGDEEETPAPAP	seq. 254 PspA4
K15	GDEEETPAPAPQPEK	seq. 255 PspA4
K16	ETPAPAPQPEKPAPA	seq. 256 PspA4
K17	PAPQPEKPAPAPAPK	seq. 257 PspA4
K18	PEKPAPAPAPKPEKS	seq. 258 PspA4
K19	APAPAPKPEKSADQQ	seq. 259 PspA4
K20	APKPEKSADQQAED	seq. 260 PspA4
K21	EKSADQQAEDYARR	seq. 261 PspA4
K22	DQQAEDYARRSEEE	seq. 262 PspA4
K23	EEDYARRSEEEYNRL	seq. 263 PspA4
K24	ARRSEEEYNRLTQQQ	seq. 264 PspA4
L 1	EEEYNRLTQQQPPKA	seq. 265 PspA4
L 2	NRLTQQQPPKAEKPA	seq. 266 PspA4
L 3	QQQPPKAEKPAPASA	seq. 267 PspA4
L 4	PKAEKPAPASAPQPS	seq. 268 PspA4
L 5	KA EKPPAPASAPQPSR	seq. 269 PspA4
L 6	VRADEAPVANQSKAE	seq. 270 PspA5
L 7	EAPVANQSKAEKDYD	seq. 271 PspA5
L 8	ANQSKAEKDYDAAVK	seq. 272 PspA5
L 9	KA EKDYDAAVKKSEA	seq. 273 PspA5
L10	DYDAAVKKSEAAKKD	seq. 274 PspA5
L11	AVKKSEAAKKDYETA	seq. 275 PspA5
L12	SEAAKKDYETAKKKA	seq. 276 PspA5
L13	KKDYETAKKKAEDAQ	seq. 277 PspA5
L14	ETAKKKAEDAQKKYD	seq. 278 PspA5
L15	KKAEDAQKKYDEDQK	seq. 279 PspA5
L16	DAQKKYDEDQKKTEE	seq. 280 PspA5
L17	KYDEDQKKTEEKAEL	seq. 281 PspA5
L18	DQKKTEEKAELVRKA	seq. 282 PspA5
L19	TEEKAELVRKADEKR	seq. 283 PspA5
L20	AELVRKADEKRQKAN	seq. 284 PspA5
L21	RKADEKRQKANLAVQ	seq. 285 PspA5
L22	EKRQKANLAVQEAYV	seq. 286 PspA5
L23	KANLAVQEAYVKFQE	seq. 287 PspA5
L24	AVQEAYVKFQEAQRE	seq. 288 PspA5
M 1	AYVKFQEAQREFNES	seq. 289 PspA5
M 2	FQEAQREFNESPSRK	seq. 290 PspA5
M 3	QREFNESPSRKKSDA	seq. 291 PspA5
M 4	NESPSRKKSDAKKKL	seq. 292 PspA5
M 5	SRKKSDAKKKLDDAS	seq. 293 PspA5
M 6	SDAKKKLDDASAHIE	seq. 294 PspA5
M 7	KKLDDASAHIEEVKL	seq. 295 PspA5
M 8	DASAHIEEVKLKQKE	seq. 296 PspA5
M 9	HIEEVKLKQKEADAN	seq. 297 PspA5
M10	VKLKQKEADANFNKE	seq. 298 PspA5
M11	QKEADANFNKEQAKV	seq. 299 PspA5

M12	DANFNKEQAKVIPEA	seq. 300	PspA5
M13	NKEQAKVIPEASDLA	seq. 301	PspA5
M14	AKVIPEASDLAVTKQ	seq. 302	PspA5
M15	PEASDLAVTKQKAAE	seq. 303	PspA5
M16	DLAVTKQKAAEEAKKE	seq. 304	PspA5
M17	TKQKAAEEAKKEAEVA	seq. 305	PspA5
M18	AAEAKKEAEVAKEKY	seq. 306	PspA5
M19	KKEAEVAKEKYDKAV	seq. 307	PspA5
M20	EVAKEKYDKAVQEVE	seq. 308	PspA5
M21	EKYDKAVQEVEVEKN	seq. 309	PspA5
M22	KAVQEVEVEKKNKILE	seq. 310	PspA5
M23	EVEVEKKNKILEQDAE	seq. 311	PspA5
M24	EKNKILEQDAENEKK	seq. 312	PspA5
N 1	ILEQDAENEKKIDVL	seq. 313	PspA5
N 2	DAENEKKIDVLQNKV	seq. 314	PspA5
N 3	EKKIDVLQNKVADLE	seq. 315	PspA5
N 4	DVLQNKVADLEKGIA	seq. 316	PspA5
N 5	NKVADLEKGIAPYQN	seq. 317	PspA5
N 6	DLEKGIAPYQNKVAE	seq. 318	PspA5
N 7	GIAPYQNKVAELNKE	seq. 319	PspA5
N 8	YQNKVAELNKEIARL	seq. 320	PspA5
N 9	VAELNKEIARLQSDL	seq. 321	PspA5
N10	NKEIARLQSDLKDAE	seq. 322	PspA5
N11	ARLQSDLKDAEENNV	seq. 323	PspA5
N12	SDLKDAEENNVEDYI	seq. 324	PspA5
N13	DAEENNVEDYIKEGL	seq. 325	PspA5
N14	NNVEDYIKEGLEQAI	seq. 326	PspA5
N15	DYIKEGLEQAIADKK	seq. 327	PspA5
N16	EGLEQAIADKKAEAL	seq. 328	PspA5
N17	QAIADKKAEALATTOQ	seq. 329	PspA5
N18	DKKAEALATTOQNIDK	seq. 330	PspA5
N19	ELATTOQNIDKTQKD	seq. 331	PspA5
N20	TQQNIDKTQKDLEDA	seq. 332	PspA5
N21	IDKTQKDLEDAELEL	seq. 333	PspA5
N22	QKDLEDAELELEKVL	seq. 334	PspA5
N23	EDAELELEKVLATLD	seq. 335	PspA5
N24	LELEKVLATLDPEGK	seq. 336	PspA5
O 1	KVLATLDPEGKTQDE	seq. 337	PspA5
O 2	TLDPEGKTQDELDKE	seq. 338	PspA5
O 3	EGKTQDELDKEAAED	seq. 339	PspA5
O 4	QDELDKEAAEDANIE	seq. 340	PspA5
O 5	DKEAAEDANIEALQN	seq. 341	PspA5
O 6	AEDANIEALQNKVAD	seq. 342	PspA5
O 7	NIEALQNKVADLENK	seq. 343	PspA5
O 8	LQNKVADLENKVAEL	seq. 344	PspA5
O 9	VADLENKVAELDKEV	seq. 345	PspA5
O10	ENKVAELDKEVTRLQ	seq. 346	PspA5
O11	AELDKEVTRLQSDLK	seq. 347	PspA5
O12	KEVTRLQSDLKDAEE	seq. 348	PspA5
O13	RLQSDLKDAEENNVE	seq. 349	PspA5
O14	DLKDAEENNVEDYVK	seq. 350	PspA5

O15	AEENNVEDYVKEGLD	seq. 351 PspA5
O16	NVEDYVKEGLDKALT	seq. 352 PspA5
O17	YVKEGLDKALTDKKV	seq. 353 PspA5
O18	GLDKALTDKKVELNN	seq. 354 PspA5
O19	ALTDKKVELNNTQKA	seq. 355 PspA5
O20	KKVELNNTQKALDTA	seq. 356 PspA5
O21	LNNTQKALDTAQKAL	seq. 357 PspA5
O22	QKALDTAQKALDTAL	seq. 358 PspA5
O23	DTAQKALDTALNELG	seq. 359 PspA5
O24	KALDTALNELGPDGD	seq. 360 PspA5
P 1	TALNELGPDGDEEET	seq. 361 PspA5
P 2	ELGPDGDEEETPAPA	seq. 362 PspA5
P 3	DGDEEETPAPAPKPE	seq. 363 PspA5
P 4	EETPAPAPKPEQPAS	seq. 364 PspA5
P 5	APAPKPEQPASAPQP	seq. 365 PspA5
P 6	APKPEQPASAPQPSR	seq. 366 PspA5

A coluna da esquerda indica o *spot* de localização do peptídeo, a coluna do meio indica as sequências peptídicas e a coluna da direita indica à qual molécula pertence a sequência peptídica.

APÊNDICE B - Sequências dos peptídeos sintetizados no segundo grupo de *peptide arrays*

A 1	VRAEESPVASQSKAE	seq. 001	PspARx1
A 2	ESPVASQSKAEKDYD	seq. 002	PspARx1
A 3	ASQSKAEKDYDAKK	seq. 003	PspARx1
A 4	KAEKDYDAKKDAKN	seq. 004	PspARx1
A 5	DYDAKKDAKNAKKA	seq. 005	PspARx1
A 6	AKKDAKNAKKAVEDA	seq. 006	PspARx1
A 7	AKNAKKAVEDAQKAL	seq. 007	PspARx1
A 8	KKAVEDAQKALDDAK	seq. 008	PspARx1
A 9	EDAQKALDDAKAAQK	seq. 009	PspARx1
A10	KALDDAKAAQKKYDE	seq. 010	PspARx1
A11	DAKAAQKKYDEDQKK	seq. 011	PspARx1
A12	AQKKYDEDQKKTEEK	seq. 012	PspARx1
A13	YDEDQKKTEEKAAL	seq. 013	PspARx1
A14	QKKTEEKAALKAAS	seq. 014	PspARx1
A15	EEKAALKAASEEMD	seq. 015	PspARx1
A16	ALEKAASEEMDKAVA	seq. 016	PspARx1
A17	AASEEMDKAVAAVQQ	seq. 017	PspARx1
A18	EMDKAVAAVQQAYLA	seq. 018	PspARx1
A19	AVAAVQQAYLAYQQA	seq. 019	PspARx1
A20	VQQAYLAYQQATDKA	seq. 020	PspARx1
A21	YLAYQQATDKAAKDA	seq. 021	PspARx1
A22	QQATDKAAKDAADKM	seq. 022	PspARx1
A23	DKAADDAADKMIDEA	seq. 023	PspARx1
A24	KDAADKMIDEAKKRE	seq. 024	PspARx1
B 1	DKMIDEAKKREEEAK	seq. 025	PspARx1
B 2	DEAKKREEEAKTKFN	seq. 026	PspARx1
B 3	KREEEAKTKFNTVRA	seq. 027	PspARx1
B 4	EAKTKFNTVRAMVVP	seq. 028	PspARx1
B 5	KFNTVRAMVVPEPEQ	seq. 029	PspARx1
B 6	VRAMVVPEPEQLAET	seq. 030	PspARx1
B 7	VVPEPEQLAETKKKS	seq. 031	PspARx1
B 8	PEQLAETKKKSEEA	seq. 032	PspARx1
B 9	AETKKKSEEAQKAP	seq. 033	PspARx1
B10	KKSEEAQKAPELTK	seq. 034	PspARx1
B11	EAKQKAPELTKLEE	seq. 035	PspARx1
B12	KAPELTKLEEAKAK	seq. 036	PspARx1
B13	LTKKLEEAKAKLEEA	seq. 037	PspARx1
B14	LEEAKAKLEEAEKKA	seq. 038	PspARx1
B15	KAKLEEAEKKATEAK	seq. 039	PspARx1
B16	EEAEKKATEAKQKVD	seq. 040	PspARx1
B17	KKATEAKQKVDAEEV	seq. 041	PspARx1
B18	EAKQKVDAEEVAPQA	seq. 042	PspARx1
B19	KVDAEEVAPQAKIAE	seq. 043	PspARx1
B20	EEVAPQAKIAELENQ	seq. 044	PspARx1
B21	PQAKIAELENQVHRL	seq. 045	PspARx1
B22	IAELENQVHRLEQEL	seq. 046	PspARx1
B23	ENQVHRLEQELKEID	seq. 047	PspARx1

B24	HRLEQELKEIDSESES	seq. 048 PspARx1
C 1	QELKEIDSESESDYA	seq. 049 PspARx1
C 2	EIDSESESDYAKEGF	seq. 050 PspARx1
C 3	SESEDYAKEGFRAPL	seq. 051 PspARx1
C 4	DYAKEGFRAPLQSKL	seq. 052 PspARx1
C 5	EGFRAPLQSKLDAKK	seq. 053 PspARx1
C 6	APLQSKLDAKKAKLS	seq. 054 PspARx1
C 7	SKLDAKKAKLSKLEE	seq. 055 PspARx1
C 8	AKKAKLSKLEELSDK	seq. 056 PspARx1
C 9	KLSKLEELSDKIDEL	seq. 057 PspARx1
C10	LEELSDKIDELDAEI	seq. 058 PspARx1
C11	SDKIDELDAEIAKLE	seq. 059 PspARx1
C12	DELDAEIAKLEDQLK	seq. 060 PspARx1
C13	AEIAKLEDQLKAAEE	seq. 061 PspARx1
C14	KLEDQLKAAEENNNV	seq. 062 PspARx1
C15	QLKAAEENNNVEDYF	seq. 063 PspARx1
C16	AEENNNVEDYFKEGL	seq. 064 PspARx1
C17	NNVEDYFKEGLEKTI	seq. 065 PspARx1
C18	DYFKEGLEKTIAAKK	seq. 066 PspARx1
C19	EGLEKTIAAKKAEELE	seq. 067 PspARx1
C20	KTIAAKKAEELEKTEA	seq. 068 PspARx1
C21	AKKAEELEKTEADLKK	seq. 069 PspARx1
C22	ELEKTEADLKKAVNE	seq. 070 PspARx1
C23	VRAEEAPVASQSKAE	seq. 071 PspA2
C24	EAPVASQSKAEKDYD	seq. 072 PspA2
D 1	ASQSKAEKDYDAAVK	seq. 073 PspA2
D 2	KAEKDYDAAVKKYKA	seq. 074 PspA2
D 3	DYDAAVKKYKAAEED	seq. 075 PspA2
D 4	AVKKYKAAEEDLKKA	seq. 076 PspA2
D 5	YKAAEEDLKKAEEAQ	seq. 077 PspA2
D 6	EEDLKKAEEAQRKYD	seq. 078 PspA2
D 7	KKAAEEAQRKYDEDQK	seq. 079 PspA2
D 8	AAQRKYDEDQKKTEE	seq. 080 PspA2
D 9	KYDEDQKKTEEKAKE	seq. 081 PspA2
D10	DQKKTEEKAKETEEA	seq. 082 PspA2
D11	TEEKAKETEEASKRQ	seq. 083 PspA2
D12	AKETEEASKRQQAAN	seq. 084 PspA2
D13	EEASKRQQAANLKYQ	seq. 085 PspA2
D14	KRQQAANLKYQLKLR	seq. 086 PspA2
D15	AANLKYQLKLREYLK	seq. 087 PspA2
D16	KYQLKLREYLKYIQE	seq. 088 PspA2
D17	KLREYLKYIQEKNKE	seq. 089 PspA2
D18	YLKYIQEKNKEKIAK	seq. 090 PspA2
D19	IQEKNKEKIAKAEKE	seq. 091 PspA2
D20	NKEKIAKAEKEMNEA	seq. 092 PspA2
D21	IAKAEKEMNEAKQEE	seq. 093 PspA2
D22	EKEMNEAKQEEDKEK	seq. 094 PspA2
D23	NEAKQEEDKEKANLN	seq. 095 PspA2
D24	QEEDKEKANLNKVLA	seq. 096 PspA2
E 1	KEKANLNKVLAQVIP	seq. 097 PspA2
E 2	NLNKVLAQVIPSDRE	seq. 098 PspA2

E 3	VLAKVIPSDRELERT	seq. 099 PspA2
E 4	VIPSDRELERTRQEA	seq. 100 PspA2
E 5	DRELERTRQEAEEKAK	seq. 101 PspA2
E 6	ERTRQEAEEKAKKNIP	seq. 102 PspA2
E 7	QEAEEKAKKNIPELKK	seq. 103 PspA2
E 8	KAKKNIPELKKKVEE	seq. 104 PspA2
E 9	NIPELKKKVEEAKQK	seq. 105 PspA2
E10	LKKKVEEAKQKVDAA	seq. 106 PspA2
E11	VEEAKQKVDAAKQKV	seq. 107 PspA2
E12	KQKVDAAKQKVDAEH	seq. 108 PspA2
E13	DAAKQKVDAEHAKEV	seq. 109 PspA2
E14	QKVDAEHAKEVAPQA	seq. 110 PspA2
E15	AEHAKEVAPQAKIAE	seq. 111 PspA2
E16	KEVAPQAKIAELENQ	seq. 112 PspA2
E17	PQAKIAELENQVRRL	seq. 113 PspA2
E18	IAELENQVRRLQDL	seq. 114 PspA2
E19	ENQVRRLQDLKDIN	seq. 115 PspA2
E20	RRLEQDLKDINESDS	seq. 116 PspA2
E21	QDLKDINESDSEDYV	seq. 117 PspA2
E22	DINESDSEDYVKEGL	seq. 118 PspA2
E23	SDSEDYVKEGLRAPL	seq. 119 PspA2
E24	DYVKEGLRAPLQSEL	seq. 120 PspA2
F 1	EGLRAPLQSELDTKK	seq. 121 PspA2
F 2	APLQSELDTKKAKLL	seq. 122 PspA2
F 3	SELDTKKAKLLKLEE	seq. 123 PspA2
F 4	TKKAKLLKLEELSGK	seq. 124 PspA2
F 5	KLLKLEELSGKIEEL	seq. 125 PspA2
F 6	LEELSGKIEELDAEI	seq. 126 PspA2
F 7	SGKIEELDAEIAELE	seq. 127 PspA2
F 8	EELDAEIAELEVQLK	seq. 128 PspA2
F 9	AEIAELEVQLKDAEG	seq. 129 PspA2
F10	ELEVQLKDAEGNNNV	seq. 130 PspA2
F11	QLKDAEGNNNVEAYF	seq. 131 PspA2
F12	AEGNNNVEAYFKEGL	seq. 132 PspA2
F13	NNVEAYFKEGLEKTT	seq. 133 PspA2
F14	AYFKEGLEKTTAEKK	seq. 134 PspA2
F15	EGLEKTTAEKKAELE	seq. 135 PspA2
F16	KTAEKKAELEKAEA	seq. 136 PspA2
F17	EKKAELEKAEADLKK	seq. 137 PspA2
F18	ELEKAEADLKKAVDE	seq. 138 PspA2
F19	AEADLKKAVDEPETP	seq. 139 PspA2
F20	LKKAVDEPETPAPAP	seq. 140 PspA2
F21	VDEPETPAPAPAPAS	seq. 141 PspA2
F22	ETPAPAPAPASAPEA	seq. 142 PspA2
F23	PAPAPASAPEAPAPA	seq. 143 PspA2
F24	PASAPEAPAPAPAPK	seq. 144 PspA2
G 1	PEAPAPAPAPKPAPA	seq. 145 PspA2
G 2	HATENERTTQVPTSS	seq. 146 PspC3
G 3	NERTTQVPTSSNRGK	seq. 147 PspC3
G 4	TQVPTSSNRGKPERR	seq. 148 PspC3
G 5	TSSNRGKPERRKAAE	seq. 149 PspC3

G 6	RGKPERRKAAEQFDE	seq. 150	PspC3
G 7	ERRKAAEQFDEYINK	seq. 151	PspC3
G 8	AAEQFDEYINKMIQL	seq. 152	PspC3
G 9	FDEYINKMIQLDKRK	seq. 153	PspC3
G10	INKMIQLDKRKHTQN	seq. 154	PspC3
G11	IQLDKRKHTQNLAFN	seq. 155	PspC3
G12	KRKHTQNLAFNIKLS	seq. 156	PspC3
G13	TQNLAFNIKLSRIKT	seq. 157	PspC3
G14	AFNIKLSRIKTEYLN	seq. 158	PspC3
G15	KLSRIKTEYLNGLKE	seq. 159	PspC3
G16	IKTEYLNGLKEKSEA	seq. 160	PspC3
G17	YLNGLKEKSEAELPS	seq. 161	PspC3
G18	LKEKSEAELPSKIK	seq. 162	PspC3
G19	SEAELPSKIKAEALDA	seq. 163	PspC3
G20	LPSKIKAEALDAAFKQ	seq. 164	PspC3
G21	IKAEALDAAFKQFKKD	seq. 165	PspC3
G22	LDAAFKQFKKDTLPT	seq. 166	PspC3
G23	FKQFKKDTLPTEPEK	seq. 167	PspC3
G24	KKDTLPTEPEKKVAE	seq. 168	PspC3
H 1	LPTEPEKKVAEAQKK	seq. 169	PspC3
H 2	PEKKVAEAQKKVEEA	seq. 170	PspC3
H 3	VAEAQKKVEEAEKKA	seq. 171	PspC3
H 4	QKKVEEAEKKAKAQK	seq. 172	PspC3
H 5	EEAEKKAKAQKEEDR	seq. 173	PspC3
H 6	KKAKAQKEEDRRNYP	seq. 174	PspC3
H 7	AQKEEDRRNYPTNTY	seq. 175	PspC3
H 8	EDRRNYPTNTYKTLE	seq. 176	PspC3
H 9	NYPTNTYKTLELEIA	seq. 177	PspC3
H10	NTYKTLELEIAEFDV	seq. 178	PspC3
H11	TLELEIAEFDVEVKK	seq. 179	PspC3
H12	EIAEFDVEVKKAELE	seq. 180	PspC3
H13	FDVEVKKAELELVKE	seq. 181	PspC3
H14	VKKAELELVKEEAKK	seq. 182	PspC3
H15	ELELVKEEAKKPLNE	seq. 183	PspC3
H16	VKEEAKKPLNEGTIK	seq. 184	PspC3
H17	AKKPLNEGTIKQAKE	seq. 185	PspC3
H18	LNEGTIKQAKEKVES	seq. 186	PspC3
H19	TIKQAKEKVESKKA	seq. 187	PspC3
H20	AKEKVESKKAETRL	seq. 188	PspC3
H21	VESKKAETRLLENIK	seq. 189	PspC3
H22	KAEATRLLENIKTDRK	seq. 190	PspC3
H23	TRLENIKTDRKKAAE	seq. 191	PspC3
H24	NIKTDRKKAEAAEAKR	seq. 192	PspC3
I 1	DRKKAEAAEAKRKADA	seq. 193	PspC3
I 2	AEAAEAKRKADAKEQD	seq. 194	PspC3
I 3	AKRKADAKEQDESKR	seq. 195	PspC3
I 4	ADAKEQDESKRRTKR	seq. 196	PspC3
I 5	EQDESKRRTKRAVPG	seq. 197	PspC3
I 6	SKRRTKRAVPGELAT	seq. 198	PspC3
I 7	TKRAVPGELATPDKK	seq. 199	PspC3
I 8	VPGELATPDKKENDA	seq. 200	PspC3

I 9	LATPDKKENDAESSD	seq. 201 PspC3
I10	DKKENDAESSDSSVG	seq. 202 PspC3
I11	NDAESSDSSVGEETL	seq. 203 PspC3
I12	SSDSSVGEETLPSPS	seq. 204 PspC3
I13	SVGEETLPSPSLKSG	seq. 205 PspC3
I14	ETLPSPSLKSGKKVA	seq. 206 PspC3
I15	SPSLKSGKKVAEAEK	seq. 207 PspC3
I16	KSGKKVAEAEKKVEE	seq. 208 PspC3
I17	KVAEAEKKVEEAEKK	seq. 209 PspC3
I18	AEKKVEEAEKKAKAQ	seq. 210 PspC3
I19	VEEAEKKAKAQKEED	seq. 211 PspC3
I20	EKKAKAQKEEDRRNY	seq. 212 PspC3
I21	KAQKEEDRRNYPST	seq. 213 PspC3
I22	EEDRRNYPSTYFSL	seq. 214 PspC3
I23	RNYPSTYFSLLELEI	seq. 215 PspC3
I24	SNTYFSLLEISESD	seq. 216 PspC3
J 1	FSLELEISESDVEVK	seq. 217 PspC3
J 2	LEISESDVEVKAEF	seq. 218 PspC3
J 3	ESDVEVKAEFELVK	seq. 219 PspC3
J 4	EVKKAEFELVKEEAK	seq. 220 PspC3
J 5	AEFELVKEEAKEPRN	seq. 221 PspC3
J 6	LVKEEAKEPRNEEKV	seq. 222 PspC3
J 7	EAKEPRNEEKVKQAK	seq. 223 PspC3
J 8	PRNEEKVKQAKAKVE	seq. 224 PspC3
J 9	EKVQAKAKVESKKA	seq. 225 PspC3
J10	QAKAKVESKKAVATR	seq. 226 PspC3
J11	KVESKKAVATRLNI	seq. 227 PspC3
J12	KKAVATRLNIKTDR	seq. 228 PspC3
J13	ATRLNIKTDRKKA	seq. 229 PspC3
J14	ENIKTDRKKAEEEEAK	seq. 230 PspC3
J15	TDRKKAEEEEAKRKA	seq. 231 PspC3
J16	KAEKKAEEEEAKRKA	seq. 232 PspC3
J17	EAKRKAEEEEAKRKA	seq. 233 PspC3
J18	KAAEEDKVKEKPAEQ	seq. 234 PspC3
J19	EDKVKEKPAEQPPA	seq. 235 PspC3
J20	KEKPAEQPPAPAPQ	seq. 236 PspC3
J21	AEQPPAPAPQPEKP	seq. 237 PspC3
J22	QPAPAPQPEKPTEEP	seq. 238 PspC3
J23	APQPEKPTEEPENPA	seq. 239 PspC3
J24	EKPTEEPENPAPAPK	seq. 240 PspC3
K 1	EEPENPAPAPKPEKP	seq. 241 PspC3
K 2	NPAPAPKPEKPAEQP	seq. 242 PspC3
K 3	PAPAPKPEKPAEQPQ	seq. 243 PspC3
K 4	VRAEEAPVASQSKAE	seq. 244 PspA6B
K 5	EAPVASQSKAEKDYD	seq. 245 PspA6B
K 6	ASQSKAEKDYDTAKR	seq. 246 PspA6B
K 7	KAEKDYDTAKRDAEN	seq. 247 PspA6B
K 8	DYDTAKRDAENAKKA	seq. 248 PspA6B
K 9	AKRDAENAKKALEEA	seq. 249 PspA6B
K10	AENAKKALEEAKRAQ	seq. 250 PspA6B
K11	KKALEEAKRAQKKYE	seq. 251 PspA6B

K12	EEAKRAQKKYEDDQK	seq. 252	PspA6B
K13	RAQKKYEDDQKKTEE	seq. 253	PspA6B
K14	KYEDDQKKTEEKAKE	seq. 254	PspA6B
K15	DQKKTEEKAKEEKQA	seq. 255	PspA6B
K16	TEEKAKEEKQASEAE	seq. 256	PspA6B
K17	AKEEKQASEAEQKAN	seq. 257	PspA6B
K18	KQASEAEQKANLQYQ	seq. 258	PspA6B
K19	EAEQKANLQYQLKLR	seq. 259	PspA6B
K20	KANLQYQLKLREYIQ	seq. 260	PspA6B
K21	QYQLKLREYIQKTGD	seq. 261	PspA6B
K22	KLREYIQKTGDRSKI	seq. 262	PspA6B
K23	YIQKTGDRSKIQKEM	seq. 263	PspA6B
K24	TGDRSKIQKEMEEAE	seq. 264	PspA6B
L 1	SKIQKEMEEAEKKHK	seq. 265	PspA6B
L 2	KEMEEAEKKHKNAKA	seq. 266	PspA6B
L 3	EAEKKHKNAKAEDFK	seq. 267	PspA6B
L 4	KHKNAKAEDFKVRGK	seq. 268	PspA6B
L 5	AKAEFDKVRGKVIPS	seq. 269	PspA6B
L 6	FDKVRGKVIPSAEEL	seq. 270	PspA6B
L 7	RGKVIPSAEELKETR	seq. 271	PspA6B
L 8	IPSAEELKETRRKAE	seq. 272	PspA6B
L 9	EELKETRRKAEAKA	seq. 273	PspA6B
L10	ETRRKAEAKAKEAE	seq. 274	PspA6B
L11	KAEEAKAKEAELTKK	seq. 275	PspA6B
L12	AKAKEAELTKKVEEA	seq. 276	PspA6B
L13	EAELTKKVEEAEEKV	seq. 277	PspA6B
L14	TKKVEEAEEKVTEAK	seq. 278	PspA6B
L15	EEAEKKVTEAKQKLD	seq. 279	PspA6B
L16	KKVTEAKQKLDAERA	seq. 280	PspA6B
L17	EAKQKLDAERAKEVA	seq. 281	PspA6B
L18	KLDAERAKEVALQAK	seq. 282	PspA6B
L19	ERAKEVALQAKIAEL	seq. 283	PspA6B
L20	EVALQAKIAELENQV	seq. 284	PspA6B
L21	QAKIAELENQVHRLE	seq. 285	PspA6B
L22	AELENQVHRLETELK	seq. 286	PspA6B
L23	NQVHRLETELKEIDE	seq. 287	PspA6B
L24	RLETELKEIDESDSE	seq. 288	PspA6B
M 1	ELKEIDESDSEDYVK	seq. 289	PspA6B
M 2	IDESDSEDYVKEGLR	seq. 290	PspA6B
M 3	DSEDYVKEGLRVPLQ	seq. 291	PspA6B
M 4	YVKEGLRVPLQSELD	seq. 292	PspA6B
M 5	GLRVPLQSELVDKQA	seq. 293	PspA6B
M 6	PLQSELVDKQAKLSK	seq. 294	PspA6B
M 7	ELDVKQAKLSKLEEL	seq. 295	PspA6B
M 8	KQAKLSKLEELSDKI	seq. 296	PspA6B
M 9	LSKLEELSDKIDELD	seq. 297	PspA6B
M10	EELSDKIDELDAEIA	seq. 298	PspA6B
M11	DKIDELDAEIAKLEK	seq. 299	PspA6B
M12	ELDAEIAKLEKDVED	seq. 300	PspA6B
M13	EIAKLEKDVEDFKNS	seq. 301	PspA6B
M14	LEKDVEDFKNSDGEY	seq. 302	PspA6B

M15	VEDFKNSDGEYSALY	seq. 303 PspA6B
M16	KNSDGEYSALYLEAA	seq. 304 PspA6B
M17	GEYSALYLEAAEKDL	seq. 305 PspA6B
M18	ALYLEAAEKDLVAKK	seq. 306 PspA6B
M19	EAAEKDLVAKKAELE	seq. 307 PspA6B
M20	KDLVAKKAELEKTEA	seq. 308 PspA6B
M21	AKKAELEKTEADLKK	seq. 309 PspA6B
M22	ELEKTEADLKKAVNE	seq. 310 PspA6B

A coluna da esquerda indica o *spot* de localização do peptídeo, a coluna do meio indica as sequências peptídicas e a coluna da direita indica à qual molécula pertence a sequência peptídica.

APÊNDICE C - Sequências do PspARx1 e dos seus fragmentos

PspARx1

VASQPTVVRAEESPVASQSKAEKDYDAAKKDAKNAKKAVEDAQKALDDAKAAQKKYDEDQKKTEEKAALEKAASE
EMDKAVAAVQQAYLAYQQATDKAAKDAADKMIDEAKKREEEAKTKFNTVRAMVVPEPEQLAETKKKSEEAKQKAP
ELTKKLEEAkakLEEAekKATEAKQKVDAEEVAPQAKIAELENQVHRLEQELKEIDeseSEDYAKEGFRAPLQSK
LDAKKAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEDQLKAAEENNNVEDYFKEGLEKTIAAKKAELEKTEADLKKAVNEPE
KPAPAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQPAPAPK

Frag1

VRAEESPVASQSKAEKDYDAAKKDAKNAKKAVEDAQKALDDAKAAQKKYDEDQKKTEEKAALEKAASEEMDKAVA
AVQQAYLAYQQATDKAAKDAADKMI

Frag2

EDQKKTEEKAALEKAASEEMDKAVAAVQQAYLAYQQATDKAAKDAADKMIDEAKKREEEAKTKFNTVRAMVVPEP
EQLAETKKKSEEAKQKAPELTKKLE

Frag3

DEAKKREEEAKTKFNTVRAMVVPEPEQLAETKKKSEEAKQKAPELTKKLEEAkakLEEAekKATEAKQKVDAEEV
APQAKIAELENQVHRLEQELKEIDE

Frag4

EAKAKLEEAekKATEAKQKVDAEEVAPQAKIAELENQVHRLEQELKEIDeseSEDYAKEGFRAPLQSKLDAKKAK
LSKLEELSDKIDELDAEIAKLEDQL

Frag5

SESEDYAKEGFRAPLQSKLDAKKAKLSKLEELSDKIDELDAEIAKLEDQLKAAEENNNVEDYFKEGLEKTIAAKK
AELEKTEADLKKAVNEPEKPAPAPE

Frag6

KAAEENNNVEDYFKEGLEKTIAAKKAELEKTEADLKKAVNEPEKPAPAPETPAPEAPAEQPKPAPAPQPAPAPKP
EKPAEQPKPEKTDQQAEDYARRS

Frag7

TPAPEAPAEQPKPAPAPQPAPAPKPEKPAEQPKPEKTDQQAEDYARRSEEEYNRLTQQQPPKAEKPAPAPKTG
WKQENG

Foram clonados os fragmentos de 100 aminoácidos do PspARx1 (com exceção do Frag 7, que possui apenas 81 aminoácidos), com uma sobreposição de 50 aminoácidos.

APÊNDICE D – Artigos publicados no período do mestrado (2012 a 2014)

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 Nov;53(5-6):243-9.

Moreno AT, Oliveira ML, Ho PL, **Vadesilho CF**, Palma GM, Ferreira JM Jr, Ferreira DM, Santos SR, Martinez MB, Miyaji EN. Cross-reactivity of antipneumococcal 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 Apr;19(4):499-507.