

STEFANIE KRASCHOWETZ

**Clonagem, produção e purificação de uma molécula recombinante
híbrida estável de duas proteínas de *Streptococcus pneumoniae*
unidas por espaçador molecular: PspA94-PdT**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

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

São Paulo
2018

RESUMO

KRASCHOWETZ, S. **Produção de uma molécula recombinante híbrida de duas proteínas de *Streptococcus pneumoniae*: PspA94-PdT.** 2018. 189 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Streptococcus pneumoniae é causa de doenças como pneumonia, otite, meningite e sepse. As vacinas hoje disponíveis têm cobertura limitada porque são baseadas no polissacarídeo capsular, que varia com os mais de 90 sorotipos da bactéria, além de levarem à substituição de sorotipos na população por outros não presentes nas formulações. Visando reduzir o custo e aumentar a cobertura, têm-se estudado vacinas baseadas em proteínas que ofereceriam proteção independente de sorotipo. Este trabalho teve por objetivo a obtenção, avaliação da estabilidade e da resposta imune em camundongos de híbridos de duas proteínas de *S. pneumoniae*: a proteína de superfície do pneumococo (PspA) e a pneumolisina geneticamente detoxificada (PdT), sem ou com espaçadores moleculares, rígido ou flexível, entre as moléculas. Os genes dos híbridos com espaçadores foram clonados através da técnica de *overlap extension PCR*. O gene das proteínas foi expresso em *E. coli* e as proteínas obtidas foram reconhecidas por anticorpos produzidos contra a célula inteira de pneumococo através de Western Blot. A purificação dos híbridos foi feita utilizando homogeneizador de alta pressão, precipitação de impurezas com detergente catiônico CTAB e diferentes etapas cromatográficas. A estabilidade foi analisada periodicamente através de SDS-PAGE e Western Blot. O híbrido sem espaçador mostrou-se instável, por isso a presença de atividade proteolítica foi investigada através de diversos ensaios para detecção dessas enzimas, mostrando que a instabilidade não decorreu de hidrólise por proteases. Os fragmentos resultantes da quebra tiveram a porção N-terminal sequenciada para identificar o sítio de clivagem, que estava localizado na junção das duas proteínas. Esse sítio foi retirado das construções seguintes e espaçadores moleculares foram incluídos entre os dois抗ígenos. A molécula com espaçador flexível foi obtida na forma solúvel durante o cultivo, porém durante a purificação ocorreu precipitação irreversível. O clone para produção do híbrido com espaçador rígido permitiu a obtenção da proteína, que foi purificada e teve a estabilidade avaliada periodicamente à 4°C e -20°C por Western Blot empregando anticorpos contra célula inteira de pneumococo, indicando que a

introdução do espaçador rígido aumentou a estabilidade do híbrido em relação à molécula sem espaçador. Além disso, diferentes concentrações de estabilizantes foram avaliadas, mostrando que em presença de trealose 1M ou glicerol 50% o híbrido com linker rígido permaneceu estável por pelo menos 4 meses a 4°C. A molécula com espaçador rígido produziu níveis de anticorpos em camundongos comparáveis aos níveis obtidos com a molécula sem espaçador, que foram capazes de proteger 100% dos animais em ensaio de desafio letal intranasal e inibir a atividade hemolítica da pneumolisina. O aumento de estabilidade do híbrido alcançado com a inserção do linker rígido juntamente com a retirada do sítio de clivagem e com a presença de estabilizantes permitem que esta molécula seja utilizada numa vacina pneumocócica proteica. Como estudos vêm demonstrando que seria necessário mais de uma proteína para formular esta nova vacina, a produção deste híbrido traz a grande vantagem de obtenção de dois抗ígenos em um único processo de produção, o que pode resultar em uma diminuição do custo da dose.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Proteína de superfície A do pneumococo (PspA). Pneumolisina detoxificada (PdT). Proteína de fusão. Espaçador molecular.

ABSTRACT

KRASCHOWETZ, S. **Production of a recombinant hybrid molecule composed of two proteins of *Streptococcus pneumoniae*: PspA94-PdT** 2018. 189 p. Thesis (Ph. D. thesis in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Streptococcus pneumoniae is cause of diseases like pneumonia, otitis, menngitis and sepsis. The vaccines available nowadays has limited coverage because they are based on the capsular polysaccharyde, which varies among the more than 90 bacteria serotypes and they lead to serotype substitution on the population for others not present on the vaccine formulations. In order to reduce the cost and increase the coverage, vaccines based on pneumococcal proteins that would offer serotype independent protection have been studied. The objective of this thesis was the obtainment, stability evaluation and immune response evaluation in mice of hybrids composed of two proteins of *S. pneumoniae*: pneumococcal surface protein A (PspA) and genetically detoxified pneumolysin (PdT), with or without molecular linkers, rigid and flexible, between the molecules. The genes with molecular linkers were cloned using the overlap extension PCR technique. The genes were expressed in *E. coli* and the proteins were recognized by anti pneumococcal whole cell in Western Blot. The hybrids were purified using high pressure homogeneizer, precipitation of impurities using cationic detergent CTAB and different chromatography steps. The stability was periodically analyzed through SDS-PAGE and Western Blot. The hybrid without linker was unstable and the presence of proteolytic activity was investigated through several methods for protease activity detection, showing that instability was not due to protease hydrolysis. The N-terminal portion of the degraded protein fragments was sequenced in order to identify the cleavage site, which was localized exactly between the two proteins. This site was removed from the other hybrids and molecular linkers were included between the two antigens. The molecule with flexible linker was obtained on the soluble form during expression, but during purification it precipitated irreversibly. The molecule with rigid linker were expressed, purified and had its stability analyzed periodically at 4°C and -20°C by Western Blot using anti pneumococcal whole cell, indicating that the insertion of the rigid linker increased the hybrid stability when compared with the hybrid without linker. Besides that, different stabilizers in different concentrations were evaluated and it was found that the presence of trehalose

1 M or 50% glycerol stabilized the hybrid with rigid linker for at least 4 months at 4 °C. The molecule with rigid linker produced levels of antibodies in mice comparable to the hybrid without linker. These antibodies were able to protect 100% of animals from lethal intranasal challenge and inhibit the haemolytic activity of pneumolysin. The stability increase due to the rigid linker together with the removal of the cleavage site and the stabilizers presence allow this hybrid molecule to be used on a novel pneumococcal vaccine. Since studies have shown that it would be necessary more than one protein to formulate this new vaccine, the production of this hybrid brings the great advantage of producing two antigens in one single process, which can decrease the dosage cost.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Pneumococcal surface protein A (PspA). Detoxified pneumolysin (PdT). Fusion protein. Molecular linker.

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae tem sido considerado por anos uma das principais causas de doenças invasivas sérias como pneumonia bacteriana, sepse, meningite e otite aguda em crianças (Vieira *et al.*, 2007; Van Der Poll e Opal, 2009; Balsells *et al.*, 2017; Van Dyke *et al.*, 2017).

A colonização da nasofaringe por *S. pneumoniae* é bastante comum e é provável que todos os humanos já tenham sido colonizados por este patógeno ao menos uma vez nos primeiros anos de vida (Bogaert *et al.*, 2004). Quando esse microrganismo invade outros nichos, tem início a doença pneumocócica. As doenças pneumocócicas podem ser menos graves, chamadas não invasivas, como sinusite, otite e pneumonia (em inglês conhecida como *community acquired pneumonia*, CAP); ou mais graves, chamadas de invasivas, como bacteremia, pneumonia necrosante, meningite e sepse.

A Organização Mundial da Saúde estima que, em 2008, das cerca de 8,8 milhões de mortes anuais globais entre crianças menores que 5 anos, 476.000 foram causadas por infecções pneumocócicas. Nos países em desenvolvimento as taxas de letalidade entre as crianças mais jovens podem chegar a 20% para sepse pneumocócica (World Health Organization, 2012). O'brien *et al.* (2009) estimou em outro estudo, em 2009, que esse microorganismo era responsável por 11% das mortes de crianças menores que 5 anos no mundo.

O tratamento de infecções pneumocócicas apresenta dificuldades devido ao aparecimento, em todo o mundo, de sorotipos de pneumococos resistentes à penicilina, azitromicina e outros antibióticos (Barocchi *et al.*, 2007; Dagan e Klugman, 2008; Greenberg *et al.*, 2008; Song, J. H. *et al.*, 2012), principalmente onde a vacinação não é rotina (Lixandru *et al.*, 2017). Por isso, a vacinação é reconhecida como a melhor maneira de combater essas patologias. A administração de vacinas tem demonstrado boa eficácia na prevenção da infecção pneumocócica, desde que a composição agregue os sorotipos prevalentes em cada região geográfica no momento da vacinação.

S. pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva que possui, como estrutura externa, uma cápsula polissacarídica que constitui o seu principal fator de virulência.

A cápsula tem a propriedade de estimular a produção de anticorpos em indivíduos imunocompetentes, anticorpos esses que são utilizados para classificar os pneumococos em sorotipos (Henrichsen, 1995). Uma revisão recente elenca 97 sorotipos distintos (Geno *et al.*, 2015), que são reconhecidos com base nas diferenças químicas e antigênicas dos polissacarídeos capsulares (PS), cuja distribuição difere por faixa etária, sintomatologia clínica e região geográfica (Hausdorff *et al.*, 2000).

Todas as vacinas pneumocócicas atualmente em uso têm como base o PS capsular livre ou conjugado a uma proteína. Em ambos os casos, os sorotipos presentes nas primeiras formulações vacinais compreendiam apenas os considerados de maior relevância epidemiológica na distribuição da doença pneumocócica nas regiões onde a vacina foi formulada. Apesar de novos sorotipos prevalentes na Ásia e América Latina terem sido adicionados nas novas formulações a fim de ganhar o mercado mundial, os problemas quanto à limitação de sorotipos ainda persistem. Cada cápsula de sorotipo diferente que compõe a formulação dessas vacinas é produzida em um processo independente, o que limita a composição da vacina, e, portanto, sua cobertura, além de acarretar um alto custo por dose e também levar à substituição dos sorotipos prevalentes na população por outros não presentes na formulação das vacinas (Weinberger *et al.*, 2009; Weinberger *et al.*, 2011; Feikin *et al.*, 2013; Balsells *et al.*, 2017).

Uma alternativa para aumentar a cobertura da vacina e, ao mesmo tempo, reduzir o custo, é obter uma vacina que utilize proteínas imunogênicas do pneumococo. Essa vacina, ao contrário da vacina baseada em polissacarídeo capsular, teria uma resposta T-dependente, tornando possível seu uso em crianças menores de 2 anos de idade e ofereceria proteção independente do sorotipo, evitando assim a pressão seletiva da vacinação que tem levado à mudança dos sorotipos prevalentes na população.

Entre as proteínas candidatas, a proteína A de superfície do pneumococo (PspA) e a pneumolisina geneticamente detoxificada (PdT) mostraram resultados promissores em modelos de sepse e a combinação destas duas proteínas geneticamente fusionadas em uma molécula híbrida apresentou maior deposição de complemento e indução de fagocitose do que a simples mistura dos抗ígenos, além de oferecer proteção contra desafio sistêmico em camundongos (Goulart *et al.*, 2013).

As proteínas de fusão são uma nova classe de biomoléculas formadas por duas ou mais proteínas ou fragmentos de proteinas que podem estar ou não unidas por espaçadores moleculares. Estudos mostraram que a junção de duas proteínas distintas em uma molécula pode levar a um aumento da atividade enzimática ou antigênica de cada uma delas ou ainda a uma atividade sinérgica de ambas (Zhao *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013), além de permitir a produção de mais de um antígeno em um único processo produtivo.

Diante do exposto, para continuarmos avançando no desenvolvimento de uma nova vacina proteica, mais barata e com cobertura independente do sorotipo, uma construção capaz de produzir a proteína híbrida PspA94-PdT em cultivos de *E. coli* de alta densidade está sendo desenvolvida. A produção desta proteína híbrida deverá gerar uma vacina mais promissora, tanto do ponto de vista econômico quanto do ponto de vista de ampliação de cobertura, do que as vacinas de PS livres e as de PS conjugadas a proteínas carreadoras não relacionadas ao pneumococo.

7 CONCLUSÕES

A construção da proteína híbrida PspA94-PdT sem espaçador, que esse trabalho se propôs inicialmente a purificar, não se mostrou estável. Essa instabilidade, que não foi resultante de degradação proteolítica, não permitiu a sua purificação em escala de bancada ao grau requerido para uso em vacinas e, com isso, inviabilizou a sua utilização posterior.

Através de Western Blot da proteína degradada e sequenciamento da porção N-terminal do fragmento que não adsorveu na IMAC-Sepharose, pois esta construção foi obtida com His-tag N-terminal, foi possível determinar que a ruptura ocorreu principalmente entre as duas proteínas. Para superar este obstáculo foi proposta a construção de novos híbridos sem o sítio de clivagem identificado no híbrido degradado e com espaçadores moleculares entre as proteínas.

A construção em *E. coli* BL21(DE3) Rosetta contendo pET-28a/pspA94-FL-pdT permitiu a produção da proteína híbrida íntegra na forma solúvel. Porém, houve uma precipitação irreversível quando a proteína já purificada foi descongelada. Todas as tentativas de ressolubilização fracassaram e as análises subsequentes não puderam ser concluídas.

A proteína híbrida com espaçador molecular rígido PspA94-RL-PdT foi produzida, purificada e a análise de sua estabilidade revelou que a proteína se manteve íntegra por 4 semanas a 4°C e por pelo menos 14 meses a -20 °C. Com isso, conclui-se que a deleção do sítio de clivagem identificado no fragmento da PspA94-PdT degradada e a inserção do espaçador molecular rígido, juntamente com a retirada da última porção da região de prolinas da PspA94 foram capazes de aumentar consideravelmente a estabilidade, o que, consequentemente, permitiu a obtenção do híbrido com maior pureza. A estabilidade pode ser ainda melhorada com a adição de 1 M de trealose, o que fez com que a proteína permanecesse íntegra por pelo menos 4 meses a 4 °C.

Os ensaios em camundongos permitiram concluir que a inserção do linker rígido não afetou a resposta imune antes verificada para o híbrido sem linker. Concentrações semelhantes de anticorpos foram obtidas por ambos os híbridos e a formulação mais

pura, com a PspA94-RL-PdT, induziu concentrações maiores de anticorpos com uma dose a menos, o que indica que a obtenção de uma molécula estável que possa ser purificada a elevado grau de pureza tem papel essencial para garantir a eficiência da resposta imune em populações mais heterogêneas.

Além disso, todas as formulações foram capazes de proteger 100% dos animais imunizados contra o desafio intranasal com uma cepa virulenta de pneumococo e os anticorpos dos animais dos 3 grupos imunizados com os híbridos foram capazes de inibir a atividade hemolítica da Ply em níveis semelhantes. Com isso, conclui-se que a PspA94-RL-PdT apresentou resposta imune não inferior à obtida anteriormente para a PspA94-PdT em ensaios em animais e que a inclusão do espaçador aumentou a estabilidade da molécula de modo a permitir sua produção e purificação em larga escala.

Apesar de a produção em bioreator ter sido suficiente para obter os resultados apresentados neste trabalho, é importante notar que a produção desta molécula em biorreatore deverá, em estudos posteriores, ser otimizada de forma a maximizar a expressão e aumentar a produtividade. Dessa forma, será possível avaliar melhor a viabilidade econômica desta proposta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

AMGEN. Enbrel (Etanercept) full prescribing information. California, USA, 2015. Disponível em: < http://pi.amgen.com/united_states/enbrel/derm/enbrel_pi.pdf >. Acesso em: 01/03/2016.

ARAI, R. et al. Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. **Protein Eng**, v. 14, n. 8, p. 529-32, Aug 2001. ISSN 0269-2139. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11579220> >.

ARAI, R. et al. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. **Proteins**, v. 57, n. 4, p. 829-38, Dec 2004. ISSN 1097-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15390267> >.

ARAKAWA, T. et al. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 46, n. 1-3, p. 307-26, Mar 2001. ISSN 0169-409X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259845> >.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Protein purification using chromatography: selection of type, modelling and optimization of operating conditions. **J Mol Recognit**, v. 22, n. 2, p. 65-76, 2009 Mar-Apr 2009. ISSN 0952-3499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18546092> >.

AZEVEDO, A. M. et al. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. **Trends Biotechnol**, v. 27, n. 4, p. 240-7, Apr 2009. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19251328> >.

BALSELLS, E. et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in children in the post-PCV era: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0177113, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28486544> >.

BARAZZONE, G. C. et al. Production and purification of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Escherichia coli*. **Procedia in Vaccinology**, v. 4, n. 4th Vaccine and ISV Annual Global Congress, p. 27-35, 2011. ISSN 1877-282X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877282X11000063> >.

BAROCCHI, M. A.; CENSINI, S.; RAPPUOLI, R. Vaccines in the era of genomics: the pneumococcal challenge. **Vaccine**, v. 25, n. 16, p. 2963-73, Apr 2007. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17324490> >.

BEALL, B. et al. Pneumococcal pspA sequence types of prevalent multiresistant pneumococcal strains in the United States and of internationally disseminated clones. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 10, p. 3663-9, Oct 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11015380> >.

*De acordo com:ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

BERRY, A. M. et al. Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 63, n. 5, p. 1969-74, May 1995. ISSN 0019-9567. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7729909>>.

BOBROVNIK, S. A.; DEMCHENKO, M. A.; KOMISARENKO, S. V. FUNDAMENTAL DIFFERENCES BETWEEN NATURAL ANTIBODIES AND POLYREACTIVE IMMUNOGLOBULINS. **Ukr Biochem J**, v. 87, n. 5, p. 46-53, 2015 Sep-Oct 2015. ISSN 2409-4943. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26717595>>.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 144-54, Mar 2004. ISSN 1473-3099. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998500>>.

BOLANOS-GARCIA, V. M.; DAVIES, O. R. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. **Biochim Biophys Acta**, v. 1760, n. 9, p. 1304-13, Sep 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814929>>.

BRANDILEONE, M. C. et al. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine**, v. 22, n. 29-30, p. 3890-6, Sep 2004. ISSN 0264-410X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364436>>.

BRANDILEONE, M. C. et al. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J Infect Dis**, v. 187, n. 8, p. 1206-12, Apr 2003. ISSN 0022-1899. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12695999>>.

BRILES, D. E. et al. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1707-11, Feb 2000. ISSN 0264-410X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10689153>>.

BRILES, D. E. et al. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. **J Infect Dis**, v. 182, n. 6, p. 1694-701, Dec 2000. ISSN 0022-1899. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069242>>.

BRILES, D. E. et al. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). **Clin Microbiol Rev**, v. 11, n. 4, p. 645-57, Oct 1998. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767061>>.

BRYKSIN, A. V.; MATSUMURA, I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. **Biotechniques**, v. 48, n. 6, p. 463-5, Jun 2010. ISSN 1940-9818. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20569222>>.

CARVALHO, R. J. **Produção e purificação de um fragmento recombinante da proteína A de superfície do clado 3 (PspA3) de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli***. 2009. (Master). Biotechnology, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

CARVALHO, R. J. et al. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 94, n. 3, p. 683-94, May 2012. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22075630> >.

CHEN, A. et al. Multivalent Pneumococcal Protein Vaccines Comprising Pneumolysoid with Epitopes/Fragments of CbpA and/or PspA Elicit Strong and Broad Protection. **Clin Vaccine Immunol**, v. 22, n. 10, p. 1079-89, Oct 2015. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26245351> >.

CHEN, X.; ZARO, J. L.; SHEN, W. C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 65, n. 10, p. 1357-69, Oct 2013. ISSN 1872-8294. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23026637> >.

CONSORTIUM, U. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Res**, v. 43, n. Database issue, p. D204-12, Jan 2015. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25348405> >.

DAGAN, R.; KLUGMAN, K. P. Impact of conjugate pneumococcal vaccines on antibiotic resistance. **Lancet Infect Dis**, v. 8, n. 12, p. 785-95, Dec 2008. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022193> >.

DANIELS, C. C.; ROGERS, P. D.; SHELTON, C. M. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. **J Pediatr Pharmacol Ther**, v. 21, n. 1, p. 27-35, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 1551-6776. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26997927> >.

DARRIEUX, M. et al. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. **Crit Rev Microbiol**, Jul 2013. ISSN 1549-7828. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895377> >.

DARRIEUX, M. et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 3, p. 273-8, Mar 2008. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287288> >.

DE LENCASTRE, H. et al. Carriage and antibiotic resistance of respiratory pathogens and molecular epidemiology of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* colonizing children in day-care centers in Lisbon: the Portuguese day-care center initiative. **Clin Microbiol Infect**, v. 5 Suppl 4, p. S55-S63, Aug 1999. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869285> >.

DE SIMONE, S. G. **A arte de purificação e caracterização de proteínas**. Brasil: RDS Gráfica e Editora Ltda., 2008. ISBN 978-85-89573-37-5.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 3, p. 297-306, 2009 May-Jun 2009. ISSN 1873-1899. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19500547> >.

DESHMUKH, R. R. et al. Large-scale purification of antisense oligonucleotides by high-performance membrane adsorber chromatography. **J Chromatogr A**, v. 890, n. 1, p. 179-92, Aug 2000. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10976805> >.

DOMMASCHK, A. et al. Nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae* triggers dendritic cell dependent antibody responses against invasive disease in mice. **Eur J Immunol**, v. 47, n. 3, p. 540-551, 03 2017. ISSN 1521-4141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28101913> >.

DONG, H.; NILSSON, L.; KURLAND, C. G. Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. **J Mol Biol**, v. 260, n. 5, p. 649-63, Aug 1996. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8709146> >.

DOS SANTOS, S. R. et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. **Vaccine**, v. 31, n. 51, p. 6150-4, Dec 2013. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747454> >.

DOUCE, G. et al. Novel mucosal vaccines generated by genetic conjugation of heterologous proteins to pneumolysin (PLY) from *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v. 28, n. 18, p. 3231-7, Apr 2010. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188176> >.

DUEGER, E. L. et al. Increasing penicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates from Guatemalan children, 2001--2006. **Int J Infect Dis**, v. 12, n. 3, p. 289-97, May 2008. ISSN 1201-9712. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035570> >.

EHRMANN, M. Ehrmann Lab - *E. coli* proteases. Alemanha, 2013. Disponível em: < <https://www.uni-due.de/zmb/members/ehrmann/e-coli-proteases/index.shtml> >. Acesso em: 22 de dezembro.

EXPASY. Instability Index, ProtParam tool. 2013a. Disponível em: < <https://web.expasy.org> >. Acesso em: 2 de abril.

EXPASY. ProtParam Tool. 2013b. Disponível em: < <http://web.expasy.org/protparam/> >. Acesso em: March, 2013.

EXPASY. ProtParam Tool. 2014. Disponível em: < <http://web.expasy.org/protparam/> >. Acesso em: February, 2014.

FEIKIN, D. R. et al. Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. **PLoS Med**, v. 10, n. 9, p. e1001517, 2013. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24086113> >.

FENOLL, A. et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). **J Clin Microbiol**, v. 36, n. 12, p. 3447-54, Dec 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817852> >.

FERNÁNDEZ-RESA, P.; MIRA, E.; QUESADA, A. R. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. **Anal Biochem**, v. 224, n. 1, p. 434-5, Jan 1995. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7710105> >.

FERREIRA, D. M. et al. Protection against nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). **Microb Pathog**, v. 48, n. 6, p. 205-13, Jun 2010. ISSN 1096-1208. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206678> >.

FIGUEIREDO, D. B. **Desenvolvimento do processo de purificação da proteína A de superfície de pneumococo do clado 4 (PspA4pro)**. 2014. (Master). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

FIGUEIREDO, D. B. et al. Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 101, n. 6, p. 2305-2317, Mar 2017. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889801> >.

FINDLOW, J. et al. Multicenter, open-label, randomized phase II controlled trial of an investigational recombinant Meningococcal serogroup B vaccine with and without outer membrane vesicles, administered in infancy. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 10, p. 1127-37, Nov 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20954968> >.

FOX, B. G.; BLOMMEL, P. G. Autoinduction of protein expression. **Curr Protoc Protein Sci**, v. Chapter 5, p. Unit 5.23, Apr 2009. ISSN 1934-3663. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19365792> >.

FRAZÃO, N. et al. Effect of the seven-valent conjugate pneumococcal vaccine on carriage and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children attending day-care centers in Lisbon. **Pediatr Infect Dis J**, v. 24, n. 3, p. 243-52, Mar 2005. ISSN 0891-3668. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15750461> >.

FREITAS-DE-SOUZA, L. A. et al. Insights into the Mechanisms Involved in Strong Hemorrhage and Dermonecrosis Induced by Atroxlysin-Ia, a PI-Class Snake Venom Metalloproteinase. **Toxins (Basel)**, v. 9, n. 8, Aug 2017. ISSN 2072-6651. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28767072> >.

GARBETT, E. A.; REED, M. W.; BROWN, N. J. Proteolysis in human breast and colorectal cancer. **Br J Cancer**, v. 81, n. 2, p. 287-93, Sep 1999. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10496354> >.

GENO, K. A. et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 3, p. 871-99, Jul 2015. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26085553> >.

GINSBURG, A. S. et al. Issues and challenges in the development of pneumococcal protein vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v. 11, n. 3, p. 279-85, Mar 2012. ISSN 1744-8395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22380821> >.

GONÇALVES, V. M. et al. Purification of capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F by a procedure suitable for scale-up. **Biotechnol Appl Biochem**, v. 37, n. Pt 3, p. 283-7, Jun 2003. ISSN 0885-4513. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12515577> >.

GOULART, C. et al. Characterization of protective immune responses induced by pneumococcal surface protein A in fusion with pneumolysin derivatives. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59605, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23533636> >.

GOULART, C. et al. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**, v. 29, n. 8, p. 1634-42, Feb 2011. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21211592> >.

GREENBERG, D. et al. The association between antibiotic use in the community and nasopharyngeal carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Bedouin children. **Pediatr Infect Dis J**, v. 27, n. 9, p. 776-82, Sep 2008. ISSN 0891-3668. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18645545> >.

HAMMERSCHMIDT, S. et al. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. **Infect Immun**, v. 73, n. 8, p. 4653-67, Aug 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040978> >.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 2, p. 54-60, Feb 1998. ISSN 0167-7799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9487731> >.

HAUSDORFF, W. P. et al. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. **Clin Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 100-21, Jan 2000. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10619740> >.

HEINEGÅRD, D.; GARDELL, S. Studies on protein-polysaccharide complex (proteoglycan) from human nucleus pulposus. I. Isolation and preliminary characterisation. **Biochim Biophys Acta**, v. 148, n. 1, p. 164-71, Oct 1967. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6077036> >.

HENRICHSEN, J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 10, p. 2759-62, Oct 1995. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8567920> >.

HIENG, B. et al. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. **J Plant Physiol**, v. 161, n. 5,

p. 519-30, May 2004. ISSN 0176-1617. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15202708> >.

HIRST, R. A. et al. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. **Clin Exp Immunol**, v. 138, n. 2, p. 195-201, Nov 2004. ISSN 0009-9104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15498026> >.

HO, S. N. et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **Gene**, v. 77, n. 1, p. 51-9, Apr 1989. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2744487> >.

HORTAL, M. et al. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in six Latin American countries: 1993-1999 surveillance. **Microb Drug Resist**, v. 7, n. 4, p. 391-401, 2001. ISSN 1076-6294. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11822779> >.

HORTON, R. M. et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. **Gene**, v. 77, n. 1, p. 61-8, Apr 1989. ISSN 0378-1119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2744488> >.

HUANG, S. S. et al. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. **Pediatrics**, v. 116, n. 3, p. e408-13, Sep 2005. ISSN 1098-4275. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16140686> >.

HUTMACHER, M. M. et al. Modeling the exposure-response relationship of etanercept in the treatment of patients with chronic moderate to severe plaque psoriasis. **J Clin Pharmacol**, v. 47, n. 2, p. 238-48, Feb 2007. ISSN 0091-2700. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244775> >.

JANSON, J.-C.; RYDÉN, L. **Protein Purification**. 2nd. Sweden: John Wiley & Sons, 1998. 695 ISBN 0-471-18626-0.

JEDRZEJAS, M. J.; LAMANI, E.; BECKER, R. S. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. **J Biol Chem**, v. 276, n. 35, p. 33121-8, Aug 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413137> >.

JEFFERIES, J. M. et al. Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. **J Infect Dis**, v. 196, n. 6, p. 936-44, Sep 2007. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17703426> >.

JENA BIOSCIENCE. 2016. Disponível em: < http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/1529_histagged_proteins.html >. Acesso em: 18/01/2016.

JENSEN, E. B.; CARLSEN, S. Production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*: expression of different precursors and physiological effects of glucose, acetate, and salts. **Biotechnol Bioeng**, v. 36, n. 1, p. 1-11, Jun 1990. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18592603> >.

JIA, B.; JEON, C. O. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. **Open Biol**, v. 6, n. 8, Aug 2016. ISSN 2046-2441. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27581654> >.

JONES, L. J. et al. Quenched BODIPY dye-labeled casein substrates for the assay of protease activity by direct fluorescence measurement. **Anal Biochem**, v. 251, n. 2, p. 144-52, Sep 1997. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9299009> >.

JOSHI, B. H.; PURI, R. K. Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and Pseudomonas exotoxin in Escherichia coli. **Protein Expr Purif**, v. 39, n. 2, p. 189-98, Feb 2005. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15642470> >.

KAMTCHOUA, T. et al. Safety and immunogenicity of the pneumococcal pneumolysin derivative PlyD1 in a single-antigen protein vaccine candidate in adults. **Vaccine**, v. 31, n. 2, p. 327-33, Jan 2013. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153437> >.

KARMALI, A. **Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes**. Boletim de Biotecnologia. Portugal: Sociedade Portuguesa de Biotecnologia. 67 2000.

KAUSHIK, J. K.; BHAT, R. Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose. **J Biol Chem**, v. 278, n. 29, p. 26458-65, Jul 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702728> >.

KNITTEL, P. S. et al. Characterising the enzymatic profile of crude tentacle extracts from the South Atlantic jellyfish Olindias sambaquiensis (Cnidaria: Hydrozoa). **Toxicon**, v. 119, p. 1-7, Sep 2016. ISSN 1879-3150. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27169682> >.

KNUDSEN, H. L. et al. Membrane ion-exchange chromatography for process-scale antibody purification. **J Chromatogr A**, v. 907, n. 1-2, p. 145-54, Jan 2001. ISSN 0021-9673. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11217020> >.

KOTIK, M. et al. High-level expression of a fungal pyranose oxidase in high cell-density fed-batch cultivations of Escherichia coli using lactose as inducer. **Protein Expr Purif**, v. 36, n. 1, p. 61-9, Jul 2004. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15177285> >.

LAIMER, J. et al. MAESTROweb: a web server for structure-based protein stability prediction. **Bioinformatics**, v. 32, n. 9, p. 1414-6, May 2016. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26743508> >.

LANDER, R. J. et al. Fractional precipitation of plasmid DNA from lysate by CTAB. **Biotechnol Bioeng**, v. 79, n. 7, p. 776-84, Sep 2002. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12209800> >.

LEBER, T. M.; BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Anal Biochem**, v. 249, n. 1, p. 24-

8, Jun 1997. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9193704> >.

LEE, C. W.; GU, M. B.; CHANG, H. N. High-density culture of Escherichia coli carrying recombinant plasmid in a membrane cell recycle fermenter. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 11, n. 1, p. 6, 1989. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com.https.sci-hub.tv/science/article/pii/0141022989901130> >.

LEE, J. et al. Secretory production of Arthrobacter levan fructotransferase from recombinant Escherichia coli. **FEMS Microbiol Lett**, v. 195, n. 2, p. 127-32, Feb 2001. ISSN 0378-1097. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11179640> >.

LEE, M. et al. Enhanced antibacterial activity of an attacin-coleoptericin hybrid protein fused with a helical linker. **Mol Biol Rep**, v. 40, n. 6, p. 3953-60, Jun 2013. ISSN 1573-4978. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23271135> >.

LEROUX-ROELS, G. et al. Safety, reactogenicity and immunogenicity of a novel pneumococcal protein-based vaccine in adults: a phase I/II randomized clinical study. **Vaccine**, v. 32, n. 50, p. 6838-46, Nov 2014. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607003> >.

LIAO, Y. H. et al. Protective mechanism of stabilizing excipients against dehydration in the freeze-drying of proteins. **Pharm Res**, v. 19, n. 12, p. 1854-61, Dec 2002. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12523665> >.

LITTMANN, M. et al. Streptococcus pneumoniae evades human dendritic cell surveillance by pneumolysin expression. **EMBO Mol Med**, v. 1, n. 4, p. 211-22, Jul 2009. ISSN 1757-4684. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20049723> >.

LIXANDRU, R. I. et al. Streptococcus pneumoniae Serotypes and Antibiotic Susceptibility Patterns in Middle Ear Fluid Isolates During Acute Otitis Media and Nasopharyngeal Isolates During Community-acquired Alveolar Pneumonia in Central Romania. **Pediatr Infect Dis J**, v. 36, n. 2, p. 151-154, Feb 2017. ISSN 1532-0987. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27798547> >.

LIÑARES, J. et al. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in Streptococcus pneumoniae over a 30-year period. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, n. 5, p. 402-10, May 2010. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20132251> >.

LU, Y. J. et al. Protection against Pneumococcal colonization and fatal pneumonia by a trivalent conjugate of a fusion protein with the cell wall polysaccharide. **Infect Immun**, v. 77, n. 5, p. 2076-83, May 2009. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19255193> >.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. Artmed, 2010.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli. **Microbiol Rev**, v. 60, n. 3, p. 512-38, Sep 1996. ISSN 0146-0749. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840785> >.

MALLEY, R. et al. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 4, p. 1966-71, Feb 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569171> >.

MANCUSO, R. I. et al. Impaired expression of CXCL5 and matrix metalloproteinases in the lungs of mice with high susceptibility to *Streptococcus pneumoniae* infection. **Immun Inflamm Dis**, Nov 2017. ISSN 2050-4527. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29119707> >.

MANGTANI, P.; CUTTS, F.; HALL, A. J. Efficacy of polysaccharide pneumococcal vaccine in adults in more developed countries: the state of the evidence. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 2, p. 71-8, Feb 2003. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560191> >.

MANN, B. et al. Broadly protective protein-based pneumococcal vaccine composed of pneumolysin toxoid-CbpA peptide recombinant fusion protein. **J Infect Dis**, v. 209, n. 7, p. 1116-25, Apr 2014. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24041791> >.

MARRIE, T. J. et al. Invasive Pneumococcal Disease: Still Lots to Learn and a Need for Standardized Data Collection Instruments. **Can Respir J**, v. 2017, p. 2397429, 2017. ISSN 1916-7245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28424565> >.

MAURIZI, M. R. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. **Experientia**, v. 48, n. 2, p. 178-201, Feb 1992. ISSN 0014-4754. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1740190> >.

MAX PLANCK INSTITUTE FOR POLYMER RESEARCH. Gel Permeation Chromatography (GPC) Size Exclusion Chromatography (SEC). 2003-2016. Disponível em: < Disponível em: < mso-bidi-font-weight:bold"><http://www.mpip-mainz.mpg.de/3250477/GPC>. Acesso em: 25/02/2016.

MCNEELA, E. A. et al. Pneumolysin activates the NLRP3 inflammasome and promotes proinflammatory cytokines independently of TLR4. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 11, p. e1001191, 2010. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21085613> >.

MEDEIROS, M. I. C. et al. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in the northeast macro-region of São Paulo state/Brazil after the introduction of conjugate vaccine. **BMC Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 590, Aug 2017. ISSN 1471-2334. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28841854> >.

MITCHELL, T. J. et al. Expression of the pneumolysin gene in *Escherichia coli*: rapid purification and biological properties. **Biochim Biophys Acta**, v. 1007, n. 1, p. 67-72, Jan 1989. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2642385> >.

MIYAJI, E. N. et al. Serotype-independent pneumococcal vaccines. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 18, p. 3303-26, Sep 2013. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269437> >.

MORENO, A. T. et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 3, p. 439-46, Mar 2010. ISSN 1556-679X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20089795> >.

MURBY, M.; UHLÉN, M.; STÅHL, S. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in Escherichia coli. **Protein Expr Purif**, v. 7, n. 2, p. 129-36, Mar 1996. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8812844> >.

NABORS, G. S. et al. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. **Vaccine**, v. 18, n. 17, p. 1743-54, Mar 2000. ISSN 0264-410X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699322> >.

NEUBAUER, P. et al. Maximizing the expression of a recombinant gene in Escherichia coli by manipulation of induction time using lactose as inducer. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 36, n. 6, p. 739-44, Mar 1992. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1369364> >.

NEW ENGLAND BIOLABS. Online Tm calculator. 2014. Disponível em: < <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator> >. Acesso em: April 2014.

NEW ENGLISH BIOLABS. PCR Troubleshooting Guide. 2015. Disponível em: < <https://www.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide> >. Acesso em: 04/05/2015.

NOVAGEN. **pET-28a-c(+) Vectors**: Novagen 1998.

NOVAGEN. **pET System Manual**: Novagen 1999.

O'BRIEN, K. L. et al. Burden of disease caused by Streptococcus pneumoniae in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, n. 9693, p. 893-902, Sep 2009. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19748398> >.

OCHOA, T. J. et al. Penicillin resistance and serotypes/serogroups of Streptococcus pneumoniae in nasopharyngeal carrier children younger than 2 years in Lima, Peru. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 52, n. 1, p. 59-64, May 2005. ISSN 0732-8893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878444> >.

OHTAKE, S.; WANG, Y. J. Trehalose: current use and future applications. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 6, p. 2020-53, Jun 2011. ISSN 1520-6017. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21337544> >.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Informe Regional de SIREVA II, 2012.** Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasores. Washington DC: www.paho.org 2013.

ORTQVIST, A.; HEDLUND, J.; KALIN, M. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and clinical features. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 26, n. 6, p. 563-74, Dec 2005. ISSN 1069-3424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16388428> >.

PADALA, C. et al. Impact of Uncontrolled vs Controlled Rate Freeze-Thaw Technologies on Process Performance and Product Quality. **PDA J Pharm Sci Technol**, v. 64, n. 4, p. 290-8, 2010 Jul-Aug 2010. ISSN 1948-2124. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21502029> >.

PANATTO, D. et al. *Neisseria meningitidis* B vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v. 10, n. 9, p. 1337-51, Sep 2011. ISSN 1744-8395. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21919622> >.

PANDURANGAN, A. P. et al. SDM: a server for predicting effects of mutations on protein stability. **Nucleic Acids Res**, May 2017. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28525590> >.

PATON, J. C.; FERRANTE, A. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. **Infect Immun**, v. 41, n. 3, p. 1212-6, Sep 1983. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6885160> >.

PIRES, D. E.; ASCHER, D. B.; BLUNDELL, T. L. DUET: a server for predicting effects of mutations on protein stability using an integrated computational approach. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Web Server issue, p. W314-9, Jul 2014. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829462> >.

POOLMAN, J. T.; PEETERS, C. C.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G. P. The history of pneumococcal conjugate vaccine development: dose selection. **Expert Rev Vaccines**, v. 12, n. 12, p. 1379-94, Dec 2013. ISSN 1744-8395. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24195479> >.

PORATH, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. **Protein Expr Purif**, v. 3, n. 4, p. 263-81, Aug 1992. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1422221> >.

PROMEGA. **Technical Manual pGEM-T and pGEM-T Easy Vector System**: Promega: 9 p. 2010.

PROTEIN CALCULATOR. Protein Calculator v. 3.4. 2013. Disponível em: < <http://protcalc.sourceforge.net/> >. Acesso em: March, 2013.

PRYMULA, R. et al. Safety and immunogenicity of an investigational vaccine containing two common pneumococcal proteins in toddlers: a phase II randomized clinical trial. **Vaccine**, v. 32, n. 25, p. 3025-34, May 2014. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24699466> >.

RAWLINGS, N. D. et al. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res**, v. 42, n. Database issue, p. D503-9, Jan 2014. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157837> >.

REDDY CHICHILI, V. P.; KUMAR, V.; SIVARAMAN, J. Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. **Protein Sci**, v. 22, n. 2, p. 153-67, Feb 2013. ISSN 1469-896X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225024> >.

REIKOFSKI, J.; TAO, B. Y. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. **Biotechnol Adv**, v. 10, n. 4, p. 535-47, 1992. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14543704> >.

REIMERDES, E. H.; KLOSTERMEYER, H. Determination of proteolytic activities on casein substrates. **Methods Enzymol**, v. 45, p. 26-8, 1976. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13263> >.

ROBBINS, J. W.; TAYLOR, K. B. Optimization of Escherichia coli growth by controlled addition of glucose. **Biotechnol Bioeng**, v. 34, n. 10, p. 1289-94, Dec 1989. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588069> >.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Front Microbiol**, v. 5, p. 172, 2014. ISSN 1664-302X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24860555> >.

ROSSJOHN, J. et al. The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from Streptococcus pneumoniae. **J Mol Biol**, v. 284, n. 2, p. 449-61, Nov 1998. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813129> >.

SADARANGANI, M.; POLLARD, A. J. Serogroup B meningococcal vaccines—an unfinished story. **Lancet Infect Dis**, v. 10, n. 2, p. 112-24, Feb 2010. ISSN 1474-4457. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20113980> >.

SALHA, D. et al. Neutralizing antibodies elicited by a novel detoxified pneumolysin derivative, PlyD1, provide protection against both pneumococcal infection and lung injury. **Infect Immun**, v. 80, n. 6, p. 2212-20, Jun 2012. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473606> >.

SANTOLAYA, M. E. et al. Immunogenicity and tolerability of a multicomponent meningococcal serogroup B (4CMenB) vaccine in healthy adolescents in Chile: a phase 2b/3 randomised, observer-blind, placebo-controlled study. **Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 617-24, Feb 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260988> >.

SARASWAT, M. et al. Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 312709, 2013. ISSN 2314-6141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24455685> >.

SARTORIUS STEDIM. Sartobind Q. 2017. Disponível em: < https://www.sartorius.com/sartorius/en/EUR/BioProcess/Process-Solutions/mAB-BioProcess/Downstream-Processing/Polishing/Sartobind®-Q/p/M_Sartobind_Q >. Acesso em: 18 de dezembro de 2017.

SATO, J. C. M. D. C. S. Fermentação Descontínua Alimentada. In: (Ed.). **Biotecnologia Industrial**. 2. Brasil: Edgard Blücher, v.2, 2001. cap. 10, p.205-218.

SCHMIDEDER, A.; WEUSTER-BOTZ, D. High-performance recombinant protein production with *Escherichia coli* in continuously operated cascades of stirred-tank reactors. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 44, n. 7, p. 1021-1029, Jul 2017. ISSN 1476-5535. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28251388> >.

SEEGER, A. et al. Comparison of temperature- and isopropyl- β -d-thiogalactopyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 10, p. 7, 1995. ISSN 10. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022994001239> >.

SENKOVICH, O. et al. Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein a provides insight into microbial defense mechanism. **J Mol Biol**, v. 370, n. 4, p. 701-13, Jul 2007. ISSN 0022-2836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17543335> >.

SHAPER, M. et al. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5031-40, Sep 2004. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321996> >.

SHULER, M. L.; KARG, F. **Bioprocess engineering : basic concepts**. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall, 1992. xvi, 479 p.

SINGH, L. R. et al. Protein and DNA destabilization by osmolytes: the other side of the coin. **Life Sci**, v. 88, n. 3-4, p. 117-25, Jan 2011. ISSN 1879-0631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21047521> >.

SONG, J. et al. PROSPER: an integrated feature-based tool for predicting protease substrate cleavage sites. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50300, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23209700> >.

SONG, J. H. et al. The relationship between pneumococcal serotypes and antibiotic resistance. **Vaccine**, v. 30, n. 17, p. 2728-37, Apr 2012. ISSN 1873-2518. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22330126> >.

SPIEGEL, H. et al. Optimization of a multi-stage, multi-subunit malaria vaccine candidate for the production in *Pichia pastoris* by the identification and removal of protease cleavage sites. **Biotechnol Bioeng**, v. 112, n. 4, p. 659-67, Apr 2015. ISSN 1097-0290. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25335451> >.

SRIVASTAVA, A. et al. The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. **Infect Immun**, v. 73, n. 10, p. 6479-87, Oct 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177320> >.

STRICKLEY, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharm Res**, v. 21, n. 2, p. 201-30, Feb 2004. ISSN 0724-8741. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032302> >.

SUBSTECH. **Homogeneizador de alta pressão** 2005.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. **Microb Cell Fact**, v. 4, n. 1, p. 1, Jan 2005. ISSN 1475-2859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629064> >.

TAYLOR, S. D. et al. The cholesterol-dependent cytolysin pneumolysin from Streptococcus pneumoniae binds to lipid raft microdomains in human corneal epithelial cells. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61300, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23577214> >.

TEGEL, H. et al. Increased levels of recombinant human proteins with the Escherichia coli strain Rosetta(DE3). **Protein Expr Purif**, v. 69, n. 2, p. 159-67, Feb 2010. ISSN 1096-0279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19733669> >.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, n. 2, p. 211-22, Sep 2006. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791589> >.

TOMANEE, P.; HSU, J. T.; ITO, Y. Fractionation of protein, RNA, and plasmid DNA in centrifugal precipitation chromatography using cationic surfactant CTAB containing inorganic salts NaCl and NH(4)Cl. **Biotechnol Bioeng**, v. 88, n. 1, p. 52-9, Oct 2004. ISSN 0006-3592. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15384057> >.

VACCINES EUROPE. How are vaccines produced? , 2017. Disponível em: < <https://www.vaccineurope.eu/about-vaccines/key-facts-on-vaccines/how-are-vaccines-produced/> >. Acesso em: 2 de dezembro de 2017.

VAN DER POLL, T.; OPAL, S. M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. **Lancet**, v. 374, n. 9700, p. 1543-56, Oct 2009. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880020> >.

VAN DYKE, M. K. et al. Etiology of Acute Otitis Media in Children Less Than 5 Years of Age: A Pooled Analysis of 10 Similarly Designed Observational Studies. **Pediatr Infect Dis J**, v. 36, n. 3, p. 274-281, Mar 2017. ISSN 1532-0987. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27918383> >.

VAN METRE, T. E. et al. Pain and dermal reaction caused by injected glycerin in immunotherapy solutions. **J Allergy Clin Immunol**, v. 97, n. 5, p. 1033-9, May 1996. ISSN 0091-6749. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8626978> >.

VANDOOREN, J. et al. Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. **Nat Methods**, v. 10, n. 3, p. 211-20, Mar 2013. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23443633> >.

VELA CORAL, M. C. et al. Pneumococcal surface protein A of invasive Streptococcus pneumoniae isolates from Colombian children. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 5, p. 832-6,

2001 Sep-Oct 2001. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11747695> >.

VIEIRA, A. C. et al. Streptococcus pneumoniae: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid. **J Pediatr (Rio J)**, v. 83, n. 1, p. 71-8, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 0021-7557. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17279283> >.

WANG, W. Oral protein drug delivery. **J Drug Target**, v. 4, n. 4, p. 195-232, 1996. ISSN 1061-186X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9010812> >.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **Int J Pharm**, v. 185, n. 2, p. 129-88, Aug 1999. ISSN 0378-5173. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10460913> >.

WEINBERGER, D. M.; MALLEY, R.; LIPSITCH, M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. **Lancet**, v. 378, n. 9807, p. 1962-73, Dec 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21492929> >.

WEINBERGER, D. M. et al. Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 6, p. e1000476, Jun 2009. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19521509> >.

WHEELWRIGHT, S. M. **Protein Purification: Desing and Scale Up of Downstream Processing**. Hanser PublishersHanser Publishers, 1991.

WITZENRATH, M. et al. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. **J Immunol**, v. 187, n. 1, p. 434-40, Jul 2011. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21646297> >.

WOLF , G. A.; WIRTH , S. J. Soluble, dye-labelled substrates for a micro-plate assay of proteinase activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, n. 3, p. 6, 1996. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016770129600005X> >.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO position paper on pneumococcal vaccines** 2012.

XIE, M.; SCHOWEN, R. L. Secondary structure and protein deamidation. **J Pharm Sci**, v. 88, n. 1, p. 8-13, Jan 1999. ISSN 0022-3549. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9874696> >.

YEE, L.; BLANCH, H. W. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of Escherichia coli. **Biotechnology (N Y)**, v. 10, n. 12, p. 1550-6, Dec 1992. ISSN 0733-222X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1369204> >.

YOTHER, J. et al. Generation and properties of a Streptococcus pneumoniae mutant which does not require choline or analogs for growth. **J Bacteriol**, v. 180, n. 8, p. 2093-101, Apr 1998. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9555891> >.

ZAFAR, M. A. et al. Host-to-Host Transmission of *Streptococcus pneumoniae* Is Driven by Its Inflammatory Toxin, Pneumolysin. **Cell Host Microbe**, v. 21, n. 1, p. 73-83, Jan 2017. ISSN 1934-6069. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28081446>>.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**. 2. Mercado Aberto, 2003.

ZHANG, J.; GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, 1998. ISSN 1432-0614.

ZHAO, H. L. et al. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein by linker engineering. **Protein Expr Purif**, v. 61, n. 1, p. 73-7, Sep 2008. ISSN 1096-0279. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541441>>.

ZHOU, A. et al. Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 36, p. 13321-6, Sep 2006. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16938877>>.