TANILA WOOD DOS SANTOS

**Análise da Resposta Celular Induzida no Pulmão pela Imunização de
Camundongos com Vacinas Pneumocócicas Híbridas PspA-PLY**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia

São Paulo
2014

TANILA WOOD DOS SANTOS

**Análise da Resposta Celular Induzida no Pulmão pela Imunização de
Camundongos com Vacinas Pneumocócicas Híbridas PspA-PLY**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Michelle Darrieux Sampaio
Bertoncini

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

Santos, Tanila Wood dos.

Análise da resposta celular induzida no pulmão pela imunização de camundongos com vacinas pneumocócicas híbridas PspA-Ply / Tanila Wood dos Santos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini.

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: Vacinas.

Versão do título para o inglês: Analysis of cellular response induced by immunization of mice with PspA-Ply anti-pneumococcal vaccines.

1. Pneumococo 2. S. pneumoniae 3. PspA 4. Pneumolisina 5. Células T 6. Citocinas I. Bertoncini, Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB023/2014

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

Candidato(a): Tanila Wood dos Santos.

Título da Dissertação: Análise da resposta celular induzida no pulmão pela
imunização de camundongos com vacinas
pneumocócicas híbridas PspA-Ply.

Orientador(a): Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini.

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:

Bragança Paulista, 30 de Agosto de 2012

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Análise da resposta celular induzida no pulmão pela imunização de camundongos com vacinas anti-pneumocócicas híbridas PSPA-PLY

ÁREA DE CONHECIMENTO: Saúde e Biológicas

Autor(es): Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini; Tanila Wood dos Santos

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Protocolo: 001.08.12

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, , analisou em reunião extraordinária no dia **30/08/2012** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: APROVADO

Carlos Augusto Real Martinez

Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa

Universidade São Francisco

Dedicado às pessoas mais especiais da minha vida:

À minha querida mãe Sara Wood (*in memoriam*) que em sua breve passagem por esse mundo me proporcionou amor e forças pra uma vida inteira! Como prometido aqui está seu nome em especial na minha primeira autoria que um dia sonhamos juntas!

Ao meu querido pai Danilo dos Santos por tudo que faz por mim desde sempre, e por toda a força que me deu para que eu concluísse mais essa etapa da minha vida! Esse mérito é seu também, meu herói!

Obrigada por tudo!!! Amo vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por estar presente na minha vida me ajudando em todos os momentos.

À minha querida “pequena-grande” família: Papai e Lara por estarem comigo em todos os momentos, me apoiando e me dando forças e me incentivando em tudo! Obrigado por ter vocês em minha vida!

À minha querida orientadora profa. Dra. Michelle Darrieux pela orientação, amizade, dedicação, incentivo, prestatividade e por toda a paciência que teve comigo! Obrigada por tudo!!!

Aos meus grandes amigos Josi, Eloá, Carol, Jonas Malengo e Josenei Santos por estarem comigo nos bons momentos mas principalmente quando eu realmente mais precisei de alguém que me estendesse a mão. Vocês são demais!!!

À Madalena, Gustavo e Monique por fazerem parte dessa minha história, pelos bons momentos que passamos juntos, e, em especial à Madalena por ter me ajudado sempre que precisei, pelas palavras de ânimo e por ter torcido por mim!

À profa. Dra. Luciana Leite por me abrir as portas do seu laboratório e por toda a ajuda e suporte que me ofertou para o desenvolvimento do meu trabalho!

À toda a equipe do laboratório do Butantan pela grande colaboração e por toda ajuda que me ofereceram para o desenvolvimento desse trabalho!

Ao Prof. Ms. Aires pela grande contribuição, dedicação, gentileza e prestatividade em todos os momentos que eu precisei da sua ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho!

Ao meu grande amigo e orientador de Iniciação Científica prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro da UNIFAG por sempre manter as portas do laboratório abertas para mim durante todo o desenvolvimento desse trabalho e por estar sempre presente em todos os momentos que precisei da sua ajuda ao longo da minha jornada acadêmica! Obrigada!!!

Aos meus queridos professores Dra. Alessandra Gambero, Dr. Lúcio Ferraz e Dra. Giovana Toffoli, por fazerem parte dessa minha história, por tudo que pude aprender com vocês, por estarem sempre presentes e me orientarem no que fosse preciso sempre que os procurei.

Aos meus queridos amigos e companheiros de equipe Greicy e Walter por sempre me darem aquela força, pela paciência que tiveram sempre para me ensinar e por sempre me ajudarem de tão boa vontade! Gente vocês são demais! Obrigada por tudo!

Aos meus amigos do Laboratório Caio, Caio Kitagaki, Ana, Tércia, Jonas, Fernandas, Juliana e Thayse por animar meus dias de trabalho e pelos conhecimentos que pudemos compartilhar.

Aos meus queridos amigos do laboratório da UNIFAG, Carol, Erica Numata, Erikinha, Cíntia, Ju, Pati, Ana Paula, Vitor e todos os velhos amigos que passaram por lá e participaram dessa história comigo Larinha, Dani, Wlad, Bia, Nathália Marisa e Demétrius, por tudo o que pude aprender com vocês e por todos os bons momentos que compartilhamos!

Aos meus queridos amigos Márcia e Carlos Crippa por todos os momentos leves e descontraídos que vocês me proporcionaram ao longo desta jornada!

Que Deus abençoe e retribua a todos vocês!!!

“Tão boa é a sabedoria como a herança, e dela tiram proveito os que vêem o sol”

(Eclesiastes 7 v.11)

RESUMO

SANTOS TW. Análise da resposta celular induzida no pulmão pela imunização de camundongos com vacinas pneumocócicas híbridas Pspa-PLY. 70p. [**dissertação (Mestrado em Biotecnologia)**]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Streptococcus pneumoniae é responsável por milhões de mortes anuais no mundo todo. As vacinas atuais são baseadas em polissacarídeos capsulares e apresentam cobertura limitada. Assim, diversas proteínas tem sido estudadas como alternativas vacinais, dentre as quais se destacam PspA e PLY. Os objetivos deste estudo foram caracterizar produção de anticorpos e a resposta celular induzida pela imunização com vacinas híbridas PspA-PLY em modelo de pneumonia. Os anticorpos apresentaram elevada capacidade de ligação a pneumococos expressando PspAs de família 2, bem como um aumento na deposição de complemento nestes isolados. A imunização com as proteínas híbridas protegeu os camundongos do desafio sistêmico com pneumococo contendo PspA de família 2. Foi desenvolvido um modelo de pneumonia lobar em camundongos, onde a imunização com PspA-PLY induziu um aumento de IL-6 e TNF nos pulmões após o desafio, porém não houve redução no número de bactérias nos pulmões dos animais. Os dados sugerem que a fusão de PspA à PLY é capaz de ampliar a cobertura protetora a isolados expressando PspAs distintas, e que essa mesma vacina é capaz de proteger os animais contra pneumonia, pela indução precoce de citocinas como IL-6 e TNF- α nos pulmões.

Palavras-chave: Pneumococo. *S. pneumoniae*. PspA. Pneumolisina. células T. citocinas.

ABSTRACT

SANTOS TW. Analysis of cellular response induced by immunization of mice with PspA-PLY pneumococcal vaccines. 70p. [Master thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Streptococcus pneumoniae is responsible for millions of deaths annually around the globe. The current vaccines are based on capsular polysaccharides, and have limited coverage. Thus, several proteins have been investigated as alternative vaccines, including PspA and PLY. The present study aimed at characterizing the antibody production and cellular immune response induced by mouse immunization with PspA-PLY hybrid vaccines in a pneumonia model. The induced antibodies demonstrated a strong recognition of pneumococci expressing family 2 PspA molecules, as well as an enhancement in complement deposition in their surface. Immunization with the fusion protein protected mice from systemic challenge with a pneumococcal isolate bearing a family 2 PspA. A model of lobar pneumonia was developed in BALB/c mice, where the immunization with the PspA-PLY fusion induced an increase in IL-6 and TNF- α production in the lungs after pneumococcal challenge, leading to a reduction on bacteria load in the lungs of immunized mice. The data suggests that fusion of PspA to PLY is capable of increasing vaccine coverage against pneumococcal infection with isolates bearing family 2 PspAs, and confer protection in mice against pneumonia, by the early production of IL-6 and TNF- α in the lungs.

Keywords: Pneumococcus. *S. pneumoniae*. PspA. Pneumolysin. T cells. cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Rotas de Infecção por <i>S. pneumoniae</i>	18
Figura 2. Imagem de <i>S pneumoniae</i>	20
Figura 3. Representação da estrutura da PspA.	25
Figura 4. Representação estrutural em fita da pneumolisina, contendo quatro domínios enumerados.	26
Figura 5. Esquema das proteínas e híbridos utilizados neste estudo.	32
Figura 6. Imagem das proteínas híbridas em gel SDS-PAGE.	42
Figura 7. Histograma da ligação de anticorpos à superfície de pneumococo 3JYP2670.	43
Figura 8. Ligação de anticorpos ao isolado 3JYP2670).	44
Figura 9. Histograma da deposição de complemento na superfície de pneumococos em presença de anticorpos	45
Figura 10. Sobrevivência dos camundongos imunizados após desafio intravenoso com <i>S. pneumoniae</i> 3JYP2670.	46
Figura 11. Contagem de bactérias em lavado pulmonar de camundongos.	47
Figura 12. Contagem diferencial do BAL de animais após desafio	48
Figura 13. Contagem de colônias bacterianas no BAL	49
Figura 14. Contagem de colônias bacterianas totais no pulmão.	50
Figura 15. Infiltrado celular total no BAL dos animais após o desafio.	51
Figura 16. Imagem de microscopia óptica dos pulmões dos animais imunizados após o desafio	53
Figura 17. Níveis de IL-6 no BAL dos animais após desafio em diferentes tempos	54
Figura 18. Níveis de secreção de TNF-α no BAL dos animais após desafio em diferentes tempos	55

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Grupos experimentais de acordo com as proteínas utilizadas na imunização	34
Tabela 2. Subdivisão dos grupos experimentais	37
Tabela 3. Grupos experimentais de acordo com as proteínas utilizadas na imunização	38
 Quadro 1. Análise do Infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais imunizados após o desafio.	 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al(OH)₃ – Hidróxido de Alumínio

BAL – Lavado Bronco Alveolar

BHE – Barreira Hemato-Encefálica

CbpA – Proteína A de Ligação à Colina

CD 4+T – Células T CD4+

CD8+T – Células T CD8+

CD40 – Antígeno de superfície CD40

CD28 – Antígeno de Superfície CD28

CDR – Região Definidora de Clado

CNS – Sistema Nervoso Central

CTB – Subunidade B da Toxina Colérica

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

IFN- γ - Interferon- γ

IL-1 – Interleucina-1

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-4 – Interleucina-4

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 – Interleucina-12

IL-17 – Interleucina-17

KDa – Kilodalton

LCR – Líquido Cefalo-Raquidiano

PcsB – Proteína de Separação de Parede Celular do Grupo B de Streptococos

PCV7 – Vacina Conjugada Pneumocócica 7- Valente

PPV23 – Vacina Pneumocócica Polissacarídica 23-Valente

Ply – Pneumolisina

Pd – Pneumolisina mutante detoxificada

PspA – Proteína de Superfície Pneumocócica A

StkP – Proteína Kinase Serina/Treonina

Th1 – Células T auxiliaries tipo 1

Th2 – Células T auxiliaries tipo 2

Th17 – Células T auxiliares tipo 17

TLR – Receptores *Toll-like*

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α

UFC – Unidade formadora de colônia

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	19
2.2 Características gerais de resposta imune do hospedeiro contra <i>S. Pneumoniae</i>	20
2.3 Vacinas pneumocócicas.....	22
2.4 Proteínas pneumocócicas candidatas vacinais	23
2.4.1 PspA.....	23
2.4.2 Pneumolisina	26
2.5 PspA e Ply coadministradas e ampliação da atividade protetora em modelos animais.....	28
3 OBJETIVOS.....	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 Aspectos Éticos.....	31
4.2 Proteínas Recombinantes.....	31
4.2.1 Expressão e Purificação das proteínas.....	32
4.2.2 Diálise e Despirogenização das proteínas.....	33
4.3 Avaliação da reatividade cruzada produzida em camundongos imunizados com as proteínas híbridas contra PspA de família 2.....	34
4.4 Ensaio de ligação de anticorpos a pneumococos expressando PspA de família 2.....	35
4.5 Ensaio de deposição de complemento na superfície de pneumococos expressando PspA de família 2.....	35
4.6 Avaliação da proteção induzida pelas proteínas híbridas contra desafio intravenoso por <i>S. pneumoniae</i>	36
4.7 Desenvolvimento do modelo de pneumonia.....	36
4.7.1 Bactérias.....	36
4.7.2 Animais e Desafio.....	36
4.8 Cinética do influxo celular no lavado broncoalveolar (BAL) dos animais após desafio.....	37
4.9 Avaliação de produção de citocinas nos camundongos imunizados após desafio nasal com St 245/00.....	38

4.9.1 Determinação do número de colônias bacterianas nos pulmões e BAL dos animais após desafio.....	38
4.9.2 Determinação do número de células totais no BAL um diferentes grupos após desafio.....	39
4.9.3 Análise histológica do infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais desafiados com St 245/00.....	39
4.9.4 Avaliação da produção de citocinas nos camundongos imunizados após desafio nasal com St 245/00.....	40
4.10 Análise da Proteção conferida pelas proteínas recombinantes contra pneumonia lobar.....	40
4.11 Análise Estatística.....	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Proteínas Recombinantes.....	42
5.2 Ensaio de ligação de anticorpos a pneumococos expressando PspA de família 2.....	42
5.3 Ensaio de deposição de complemento na superfície de pneumococos expressando PspA de família 2.....	44
5.4 Avaliação da proteção induzida pelas proteínas híbridas contra desafio intravenoso por <i>S. pneumoniae</i>.....	45
5.5 Desenvolvimento de um modelo de pneumonia lobar em camundongos.....	46
5.6 Cinética do influxo celular no lavado broncoalveolar (BAL) dos animais após desafio.....	47
5.7 Proteção contra infecção bacteriana pulmonar em animais imunizados.....	48
5.7.1 Cinética bacteriana no BAL e pulmões durante as horas iniciais da infecção.....	48
5.7.2 Contagem bacteriana nos pulmões após 7 dias de desafio: Proteção.....	49
5.8 Infiltrado celular nos pulmões e Lavado Broncoalveolar (BAL) dos camundongos imunizados com as diferentes formulações.....	50
5.8.1 Cinética do Influxo celular total no BAL dos animais imunizados.....	50
5.8.2 Análise histopatológica do infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais imunizados após o desafio.....	52
5.9 Análise da Produção de citocinas nos animais imunizados após o desafio.....	53
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÃO.....	65
8. REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae é a principal causa de morbidade e mortalidade em crianças mundialmente, principalmente em países em desenvolvimento. É estimado que 10.6 milhões de crianças menores de cinco anos são acometidas por doença pneumocócica anualmente (WHO, 2006). É também responsável por milhões de mortes anualmente por pneumonia, meningite e septicemia, além de ocasionar outras infecções de menor gravidade, tais como otite média e sinusite (**Figura 1**) (McNeela et al., 2010).

O tratamento das infecções pneumocócicas é baseado na antibioticoterapia que, em geral, é empírica quanto à etiologia e à sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos. Diante do isolamento da bactéria em cultura e do antibiograma, a antibioticoterapia pode ser devidamente ajustada. A penicilina é a droga de escolha para muitas doenças pneumocócicas; entretanto, com a descrição crescente de cepas resistentes à penicilina e outros antimicrobianos, tais como cefalosporinas e macrolídeos, esquemas alternativos têm sido propostos (Appelbaum, 2002).

O *S. pneumoniae* é classificado, com base na composição de cápsula polissacarídica, em 93 sorotipos diferentes, pertencentes a 46 sorogrupos. Os sorotipos diferem quanto à prevalência geográfica, taxa de infecção, distribuição etária, tendência a causar surtos e propensão a adquirir genes de resistência antimicrobiana. Devido à sua elevada imunogenicidade e localização superficial, os polissacarídeos capsulares constituem a base das vacinas pneumocócicas atuais, isolados ou conjugados a proteínas carreadoras; os sorotipos presentes nessas formulações compreendem apenas os considerados de maior relevância epidemiológica na distribuição de doenças pneumocócicas no mundo (Jourdain et al., 2011).

No entanto, dado o limitado número de sorotipos presentes nessas formulações e sua utilização em larga escala, têm-se observado um aumento considerável do número de doenças pneumocócicas causadas por sorotipos não incluídos nas vacinas. Outro problema em questão refere-se ao elevado custo de sua produção, o que torna inviável a inclusão de todos os sorotipos em uma única formulação (Miyaji et al., 2012).

Dentro desse contexto, surgem diversas propostas e estudos sobre novos candidatos vacinais contra *S. pneumoniae*. Uma possível alternativa ou abordagem complementar é a utilização de proteínas pneumocócicas capazes de proporcionar proteção. Esses antígenos podem ser produzidos como proteínas recombinantes, com custo inferior ao das vacinas

polissacarídicas, e são capazes de ativar respostas T-dependentes, eficazes em crianças e idosos. A possibilidade de inclusão de proteínas na vacina oferece um maior potencial de ativação de múltiplos mecanismos de defesa (Briles, 2003).

Figura 1. Rotas de Infecção por *S. pneumoniae*. Quando os pneumococos se espalham para os seios da face, ouvido, pulmão e corrente sanguínea, podem causar doenças como sinusite, otite média, pneumonia, septicemia. A invasão do sistema nervoso central (CNS) por pneumococos do sangue ou diretamente a partir da nasofaringe causa meningite.

Retirado do site: <http://www.hindawi.com/journals/ipid/2009/214216.fig.001.jpg>

Dentre as diversas proteínas investigadas atualmente, a Pnemolisina (PLY) e a Proteína de Superfície Pneumocócica A (PspA) tem sido sugeridas em estudos, como potentes candidatas à inclusão em vacinas de subunidade contra infecção pneumocócica (Darrieux et al., 2007; Homma et al., 2011; McNeela et al., 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Pertencente ao gênero *Streptococcus*, família *Streptococcaceae*, *S. pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva, encapsulada que se apresenta em pares –diplococos – ou em cadeias curtas (**Figura 2**). É uma bactéria anaeróbia facultativa, alfa-hemolítica, catalase-negativa e capaz de fermentar uma ampla variedade de carboidratos para obtenção de energia (IAL, 2010; Rossoni et al., 2008; WHO, 2006). São microorganismos imóveis, não formadores de esporos, envolvidos por uma cápsula polissacarídica externa, que é o fator primário de virulência da bactéria. Abaixo da cápsula, está a parede celular rica em ácido teicóico e responsável por intensa resposta inflamatória, e a membrana citoplasmática. Além destes, outros fatores de virulência importantes podem ser destacados, tais como a PLY, a qual leva à formação de poros e lise osmótica de células epiteliais, autolisina, e a PspA, que interfere na fagocitose e função imune no hospedeiro.

O *S. pneumoniae* faz parte da flora comensal do trato respiratório superior, juntamente com *Moraxella cattarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* e outras espécies do gênero *Streptococcus* hemolíticos. Estima-se que cerca de 40 a 70% dos indivíduos têm a nasofaringe colonizada pela bactéria (Bogaert, 2004; De Lencastre et al., 1999), sendo que crianças representam o maior reservatório para a transmissão pneumocócica dentro da comunidade. A colonização é também reconhecida como a primeira etapa de desenvolvimento da doença. Embora a colonização com pneumococos seja comumente assintomática, ela pode progredir à doença respiratória ou até mesmo sistêmica. Uma característica importante é que as doenças pneumocócicas não ocorrem sem precedente colonização nasofaríngea com a linhagem homóloga (Bogaert, 2004; De Lencastre et al., 1999; Jourdain, 2011). Outros fatores associados, tais como resfriados comuns ou outras infecções virais das vias respiratórias superiores alteram o revestimento do trato respiratório e permitem que a bactéria entre na corrente sanguínea. Os pneumococos são então transportados ativamente pelas camadas endoteliais intactas através da ligação a receptores específicos e translocação. As células endoteliais normalmente separam o sangue do tecido neuronal formando a protetora barreira hematoencefálica (BHE). A integridade dessa barreira é comprometida pela apoptose das células endoteliais. O rompimento da BHE permite a invasão adicional de líquido cefalorraquidiano (LCR) e o estabelecimento da meningite. A

severidade dos efeitos de infecções pneumocócicas varia consideravelmente, sendo que 30-60% dos sobreviventes de doença invasiva desenvolvem seqüelas a longo-prazo, incluindo perda de audição, deficiências neurológicas e prejuízos neuropsicológicos (Bogaert, 2004).

Figura 2. Imagem de *S. pneumoniae*. Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo com destaque da cápsula polissacarídica (em asteristico) visualizada em detector Everhart Thornley SE em aumento de 50:50 e aceleração de voltagem de 5 kV. (Hammerschmidt et al., 2005.)

2.2 Características gerais da resposta imune do hospedeiro contra *S. pneumoniae*

A imunidade inata desempenha um papel crítico na resistência às infecções respiratórias causadas por pneumococos, tanto em humanos como em modelos experimentais. A proteção oferecida pela resposta inata é caracterizada pelo influxo precoce de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos, embora nos pulmões a infiltração de células CD4⁺ T também esteja envolvida na resistência precoce à infecção pneumocócica. Outro componente-chave da imunidade inata é a ativação e deposição do componente C3 do Sistema Complemento sobre a superfície do pneumococo.

A ativação da imunidade inata é não somente crítica como primeira linha de defesa contra pneumococos, mas também para a geração de uma resposta adaptativa apropriada. Têm-se proposto que a imunidade adquirida contra a colonização nasofaríngea por *S. pneumoniae* pode ser mediada por células CD4⁺ T e independente de anticorpos (Marqués et al., 2012).

Estudos realizados em modelo animal demonstraram que as citocinas IL1- β , IFN- γ e IL-17 exercem importante efeito protetor na imunidade contra pneumococos. McNeela et al. (2011), em estudo avaliando resposta celular estimulada por PLY, observou que esta proteína apresenta sinergismo com um agonista de receptores *Toll-like 4* (TLR4), promovendo

aumento da secreção de citocinas próinflamatórias, dentre as quais IL-1 β , IL-1 α , IL-6 e TNF- α por células dendríticas e aumento da secreção de IL-17A e IFN- γ por esplenócitos.

Citocinas incluindo IL-6 e TNF- α tem demonstrado importante papel na diferenciação de células Th17, enquanto IL-1 β , IL-1 α , IL-6 e TNF- α podem estimular a produção de IL-17 por células T $\gamma\delta$ e também promover diferenciação e expansão de células T (McNeela et al., 2011).

Estudos *in vivo* descrevem a interação entre proteínas do complemento e surfactantes, TLRs e células T durante a fase inicial do processo de infecção pneumocócica. Durante essa etapa, o processo de fixação e colonização do trato respiratório superior (nasofaringe) é de suma importância, e representa fator determinante da patogenicidade pneumocócica (Kadioglu & Andrew, 2004).

Uma vez bem sucedido o processo de fixação e colonização da nasofaringe, os pneumococos podem ter acesso ao trato respiratório inferior onde ativam mecanismos de defesa imune local. Subsequentemente, outros mecanismos de resposta imune do hospedeiro são ativados via TLRs e tem suas respostas mediadas por células T, as quais tem uma grande contribuição na resposta precoce de proteção contra o pneumococo. (revisados por Kadioglu & Andrew, 2004). Os pneumococos são considerados patógenos estritamente extracelulares, cuja eliminação depende da ingestão e morte por fagócitos (macrófagos presentes nos tecidos e alvéolos e neutrófilos recrutados durante o processo inflamatório). No entanto, fatores determinantes da patogenicidade pneumocócica, tais como sua camada polissacarídica espessa e hidrofílica dificultam sua eliminação por fagócitos na ausência de anticorpos capsulares específicos (Martner et al., 2009).

A habilidade dos fagócitos em eliminar microorganismos é aumentada em resposta a citocinas como Interferon gamma (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF), os quais impulsionam o mecanismo bactericida e melhoram a capacidade de digestão e morte da bactéria presente dentro dos fagossomos. O TNF é produzido por monócitos/ macrófagos e células T ativadas, enquanto o IFN- γ é produzido por células NK (*Natural Killers*) e células T (Martner et al., 2009).

Além destas, a IL-17A, produzida por células Th17, é um fator chave na proteção imunológica contra a colonização pneumocócica, sendo essencial para o recrutamento de macrófagos e neutrófilos para a nasofaringe (Marqués et al., 2011). Marqués et al. (2011) ao avaliar as respostas humoral e celular em modelo de pneumonia aguda, observou que o aumento da expressão de IL17 em decorrência do recrutamento de células Th17 expressando

essa citocina nos pulmões de animais, resultou em um aumento no tempo de sobrevivência após desafio com doses subletais de *S. pneumoniae* sorotipo 1.

Schmid et al. (2011) ao isolar células T em amostras de sangue de voluntários saudáveis de diferentes faixas etárias, avaliou a resposta celular através da mensuração de citocinas em resposta às três proteínas pneumocócicas, PcsB, StkP e PspA. O autor observou um modesto efeito imunogênico de PspA em comparação às outras duas proteínas avaliadas, e uma predominância de resposta Th17 constatada pelo aumento da expressão de IL-17 em resposta a essas proteínas em todos os grupos etários. Neste mesmo estudo, foi também observado que a produção de IL-17 foi muito frequentemente acompanhada pelo aumento da expressão de IFN- γ ou por uma resposta combinada entre IFN- γ e IL-5 em jovens e adultos, demonstrando também a presença de respostas Th1 e Th2, respectivamente. Segundo o autor, a produção de IFN- γ já havia sido descrita em outros estudos após a estimulação com as proteínas pneumocócicas CbpA ePLY.

2.3 Vacinas pneumocócicas

Dados da Organização Mundial da Saúde estimam que a imunização previne cerca de 2 a 3 milhões de mortes anualmente contra diversas doenças infecciosas. A cobertura global de vacinação - referente à proporção mundial de crianças que recebem as vacinas recomendadas - tem permanecido estável durante os últimos anos. Vacinas pneumocócicas foram introduzidas em 88 países até o final de 2012, e a cobertura global é de 19% (WHO, 2013).

As primeiras vacinas polissacarídicas pneumocócicas foram licenciadas em 1977, e eram compostas de polissacarídeos capsulares purificados. A formulação atualmente em uso inclui polissacarídeos dos 23 sorotipos mais prevalentes nos EUA e Europa (Pneumovax® 23; Merck), sendo 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F (Braido et al., 2008; Pletz et al., 2008). É indicada para idosos, tendo se mostrado eficaz em adultos e crianças acima de 2 anos. No entanto, devido à natureza química dos antígenos, se mostra pouco eficaz em crianças menores de 2 anos e imunocomprometidos. Além disso, uma vez que a resposta a polissacarídeos é T-independente, essa vacina não induz memória imunológica, oferecendo, portanto, um período de proteção limitado. (García-Suárez et al., 2006; Pletz et al., 2008; Miyaji et al., 2012).

As vacinas conjugadas são compostas de polissacarídeos ligados quimicamente a proteínas carreadoras, como toxóide diftérico, o que resulta na produção de anticorpos T-dependentes,

conferindo imunidade duradoura contra os sorotipos presentes na formulação. A vacina 7-valente (PCV7) licenciada desde o ano 2000 levou à diminuição na incidência de doenças pneumocócicas invasivas e declínio da colonização por pneumococos, reduzindo a circulação da bactéria na comunidade por imunidade herdada. A fim de ampliar a cobertura vacinal, duas novas opções de vacinas conjugadas contendo maior número de sorotipos foram desenvolvidas, a Previnar 13® (Pfizer) (PCV13) e a Synflorix™ GSK (PCV10) (Miyaji et al., 2012).

No Brasil, duas vacinas anti-pneumocócicas fazem parte da lista de vacinas preconizadas pelo Ministério da Saúde: a pneumocócica 23-valente (PPV23) e a pneumocócica 10-valente (PCV10). Os sorotipos que compõem estas vacinas são aqueles considerados de maior relevância epidemiológica na distribuição das doenças pneumocócicas no mundo. Em função da disseminação das cepas resistentes ao pneumococo pela penicilina, as vacinas tornaram-se a principal prevenção contra este microorganismo (BRASIL, 2010).

Entretanto, com a utilização difundida desse tipo de formulação tem sido observado um considerável aumento no número de casos de doenças pneumocócicas causadas por sorotipos não incluídos nas vacinas. Outro agravante dessa situação deve-se ao fato do alto-custo da produção dessas vacinas que, aliado à dificuldades no processo de conjugação, tornam inviável a inclusão de todos os sorotipos numa única formulação (Miyaji et al., 2012).

Nesse sentido, faz-se necessário o desenvolvimento de novas formulações, mais eficazes, capazes de ampliar a cobertura vacinal além de conferir imunidade duradoura e ser aplicável à todos os grupos de risco. Nos últimos anos, estudos têm sugerido diversas proteínas associadas à virulência como candidatos a antígenos para formulação de uma vacina protéica (Garcia-Suárez et al., 2006; Ogunniyi et al., 2007; Barocchi et al., 2007)

2.4 Proteínas pneumocócicas candidatas vacinais

2.4.1 PspA

PspA é um fator de virulência exposto, ancorado na parede celular de *S. pneumoniae*, com ampla distribuição entre os isolados clínicos. As proteínas PspA apresentam massa molecular entre 67 e 99 kDa, sendo divididas em 4 regiões: a região N-terminal de α -hélice altamente carregada, a região rica em resíduos de prolina, a região de ligação à colina e uma cauda C-terminal de 17 aminoácidos com caráter hidrofóbico. A região N-terminal inclui a maior parte dos epitopos imunogênicos, e apresenta variabilidade estrutural e sorológica.

Análises de sequenciamento levaram à classificação das PspAs em 6 clados que podem ser agrupados em 3 famílias, com base em variações na sequência conhecida como CDR, localizada na segunda metade da região amino-terminal (**Figura 3**) (Hollingshead et al., 2000; Waltman et al., 1990).

Dados de isolados obtidos em diversas partes do mundo mostram que mais de 90% dos pneumococos expressam PspAs pertencentes às famílias 1 e 2 (Briles, et al., 2000). Na América do Sul, estudos feitos no Brasil e na Colômbia, mostram resultados similares, com a prevalência de linhagens com PspA pertencentes às famílias 1 e 2 em 94% e 97,5% dos isolados, respectivamente (Brandileone et al., 2004; Vela Coral et al., 2001).

A família 1 de PspA inclui os clados 1 e 2, a família 2, clados 3 a 5, e a família 3, clado 6. Tem sido sugerido que a combinação de 3 antígenos de PspA, sendo um pertencente à família 1 (clado 2) e dois da família 2 (clados 3 e 4) poderiam induzir proteção contra uma ampla variedade de isolados de *S. pneumoniae*. Existe a hipótese de que o polimorfismo da PspA é atribuível à seleção imunológica e confirmado indiretamente que este antígeno é facilmente acessível aos anticorpos na superfície do pneumococo intacto. Entretanto, em um ensaio clínico com uma PspA recombinante derivada da linhagem Rx1 (família 1, clado 2), foi observada a produção de anticorpos com ampla reatividade cruzada contra PspAs das duas famílias, um efeito provavelmente devido à exposição natural do homem ao pneumococo desde a infância (Baril et al., 2006).

As famílias de PspA apresentam graus de reatividade cruzada muito variáveis (Nabors et al., 2000). Estudos mostram que moléculas de PspAs de famílias diferentes induzem anticorpos com capacidades distintas de reconhecimento de moléculas heterólogas (Darrieux et al., 2008; Moreno et al., 2010). Essa variabilidade no reconhecimento também pode ser observada em proteínas do mesmo clado, como demonstrado em um estudo de variabilidade entre PspAs de família 1 que identificou dois fragmentos recombinantes, PspA245 e PspA94, capazes de induzir anticorpos com ampla reatividade cruzada dentro desta família (Goulart et al., 2011).

PspA está envolvida em diferentes etapas da patogênese da bactéria (Kadioglu et al., 2008; Price & Camilli 2009; Frolet et al., 2010; Yoo et al., 2010) e desempenha um papel crucial na produção de anticorpos opsonizantes, capazes de induzir a deposição de proteínas do sistema complemento, com consequente fagocitose da bactéria. Além deste efeito sobre o sistema complemento, PspA é capaz de ligar-se à lactoferrina, uma proteína com efeito bactericida presente nas secreções mucosas e grânulos de neutrófilos, e prevenir a morte da

bactéria (Price & Camilli, 2009; Yoo et al., 2010). PspA tem se mostrado imunogênica e protetora em diversos modelos (Oliveira, et al., 2010; Goulart et al., 2011).

Figura 3. Representação da estrutura da PspA. Da esquerda para a direita, observa-se a região a cauda C-terminal (região líder), a região N-terminal em α -hélice, rica em epítomos antigênicos. A região N-terminal foi subdividida nas porções A, B e C, onde a região B, também conhecida como “região definidora de clado” (CDR); a região rica em resíduos de prolina e; a região de ligação à colina.

Em estudo recente, Lima et al. (2012), demonstrou, após imunização intranasal com PspA em camundongos, que o controle da resposta inflamatória nos pulmões ocorreu mesmo em presença de altas cargas pneumocócicas. Essa resposta foi caracterizada por um acentuado pico de infiltrado neutrofílico e linfocitário com simultânea diminuição no número de macrófagos na mucosa respiratória, 12 horas pós-desafio. Em relação ao perfil de citocinas observado, a secreção IL-6 e IFN- γ foi reduzida 24 horas após desafio, enquanto a indução da secreção de TNF- α , observada nas primeiras horas pós-desafio foi completamente suprimida dentro de 24 horas. Anteriormente e 12 horas após desafio, foi observado que os animais imunizados demonstravam elevados números de células CD4+T, CD8+T e Linfócitos B em seus pulmões quando comparados aos controles. Além disso, também foi observado que altos níveis de anticorpos anti-PspA em mucosas foram mantidos nos camundongos vacinados, durante o desafio, sugerindo, dessa forma, um papel importante destes na proteção.

Adicionalmente, outros estudos mostram que o uso de adjuvantes, tais como hidróxido de alumínio, que também estimulam resposta imune Th-1 contra PspA otimizam os mecanismos de proteção contra infecção pneumocócica (Arulanandam et al., 2001; Ferreira et al., 2008; Ferreira et al., 2009).

2.4.2 Pneumolisina

A PLY, outro fator de virulência expresso em todos os isolados clínicos de *S. pneumoniae*, é uma toxina, membro da família das citolisinas dependentes de colesterol, uma família que inclui a perfringolisina O e a streptolisina O, expressas por *Clostridium perfringens* e *Streptococcus pyogenes*, respectivamente. Uma característica clássica dessas toxinas é sua habilidade de criar poros em membranas contendo colesterol, resultando em lise celular (Cockeran et al., 2005; McNeela et al., 2010). A PLY é um monômero solúvel com cerca de 53 KDa, formado por 471 aminoácidos, distribuídos em quatro domínios (**Figura 4**) que sofrem alterações conformacionais após interagir com o colesterol presente nas membranas celulares eucarióticas que favorecem a lise dessas células (Bhakdi et al., 1988; Nakamura et al., 1998; Tylley et al., 2005; Rossjohn et al., 1997).

Figura 4. Representação estrutural em fita da pneumolisina, contendo quatro domínios enumerados. As três hélices pequenas (verde claro) no domínio 3, junto ao domínio 2, dobram-se para formar a estrutura em grampo β na membrana durante a formação de poros (Shepard et al., 1998). A estrutura em azul na forma de círculo no domínio 4 auxilia a formação dos poros; em vermelho no domínio 4 está representada a estrutura responsável por ligar-se ao colesterol da membrana; em amarelo também no domínio 4 é responsável pela ativação do complemento (Gilbert et al., 1999).

A PLY também tem se mostrado necessária para a propagação de pneumococos dos pulmões para a corrente sanguínea, estando implicada em diversas etapas da patogênese pneumocócica, incluindo a ativação do complemento, inibição dos movimentos ciliares do epitélio respiratório humano e rompimento das junções entre células epiteliais (Kadioglu et al., 2008; Ogunniyi et al., 2007). PLY induz apoptose em diferentes tipos celulares (Marriott & Dockrell, 2006), bem como a maturação de células dendríticas, produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação do inflamassoma nestas células (Littmann et al., 2009).

Embora seja classicamente descrita como uma toxina citoplasmática, foi recentemente relatado que ela está localizada na parede celular da bactéria (Price & Camilli, 2009; Yoo et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que PLY pode ser liberada da bactéria durante seu crescimento, levando à ativação de complemento longe da superfície bacteriana (Balachandran et al., 2001).

Foi demonstrado ainda que PLY ativa a imunidade inata pela interação direta com receptores *Toll-like* 4 (TLR-4), resultando em imunidade protetora contra infecção pneumocócica (Malley et al., 2003).

Devido à indução de síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL1- β (considerado um pirógeno endógeno, e potente ativador de IL-17) e TNF- α , a PLY é tida como responsável por parte dos sintomas de inflamação causados por doenças pneumocócicas. (Barocchi et al., 2007).

A PLY possui alta toxicidade quando se apresenta em sua conformação original, portanto, sua utilização como componente vacinal deve necessariamente incluir a produção de formas detoxificadas, que mantenham as características imunogênicas, sem causar a lise celular. Mediante esse fato, uma série de moléculas detoxificadas, produzidas através de métodos químicos ou por mutagênese sítio dirigida, foram geradas e avaliadas quanto à imunogenicidade e toxicidade, com resultados variáveis (Berry et al., 1995).

Uma única mutação na região Cys-428 por Gly foi descrita como PdA (Paton et al., 1991); um mutante duplo, denominado PdB, contendo uma substituição de Cys para Gly na posição 428 e outra de Trp para Phe na posição 433, apresentou 0,001% da atividade hemolítica da proteína nativa (Saunders et al., 1989); finalmente, um mutante triplo, o PdT incluindo as duas mutações citadas anteriormente mais a troca de uma Asp para Asn na posição 385, apresentou inativação completa das propriedades citolítica e de ativação de complemento. Berry et al. (1995), mostrou que uma única mutação na posição 367, substituindo uma His por uma Arg, bloqueava a capacidade de oligomerização da toxina na

membrana celular, reduzindo a toxicidade para cerca de 0,02% em comparação com a proteína nativa, porém sem afetar o domínio de interação com o sistema complemento

2.5 PspA e PLY coadministradas e ampliação da atividade protetora em modelos animais

Com base no potencial imunogênico da PspA e PLY demonstrados na literatura científica, novos estudos exploram a efetividade do uso dessas duas proteínas coadministradas em modelos experimentais, tais como modelos de bacteremia e de pneumonia.

Em estudo realizado por Briles et al. (2003), verificou-se que animais imunizados com uma mistura contendo PspA e PLY apresentaram maior proteção contra infecção pulmonar com *S. pneumoniae* do que grupos imunizados somente com as proteínas isoladas, em modelos de pneumonia.

Ogunniyi et al. (2007), investigando os efeitos de mutações únicas e combinadas em genes codificantes de PLY, PspA e PspC sobre a patogenicidade de *S. pneumoniae* sorotipo 2 (D39), mostrou que animais desafiados por via intranasal com bactérias que apresentavam mutações combinadas de PspA e PLY apresentaram colonização bacteriana nasofríngea e pulmonar reduzida quando comparados com grupos desafiados com bactérias que apresentavam mutação para apenas uma das proteínas. Adicionalmente, verificou-se também em modelo de bacteremia que grupos desafiados com as bactérias de mutação combinada apresentaram tempo de sobrevivência significativamente maiores que os grupos desafiados com bactérias de mutação única.

Mediante a eficácia dos resultados demonstrados por esses estudos, a hipótese de que a fusão dessas duas proteínas poderia apresentar efeitos potencializados, surge como uma nova estratégia no desenvolvimento de vacinas anti-pneumocócicas. Em estudo recente, realizado por nosso grupo, foram desenvolvidas duas formas detoxificadas de PLY, PID1 contendo uma mutação, e PID2, contendo duas mutações. Estes mutantes foram fusionados geneticamente ao fragmento codificante da porção N-terminal de PspA 245 (clado 1), produzindo duas proteínas híbridas, PspA1-PID1 e PspA1-PID2. Os mutantes e híbridos foram utilizados na imunização de camundongos, e mostraram-se bastante imunogênicos, induzindo elevados níveis de anticorpos contra as duas proteínas contidas na formulação. Esses anticorpos também se mostraram capazes de ativar a deposição de C3 complemento na superfície de pneumococos por FACS, e de aumentar a fagocitose das bactérias por fagócitos peritoneais de camundongo, *in vitro* (Goulart et al., 2013).

Uma vez que diversos estudos têm sugerido uma importante contribuição da resposta imune celular na proteção contra infecções pneumocócicas, o presente trabalho avaliou a produção de citocinas e proliferação de linfócitos em resposta à imunização com proteínas híbridas, PspA-PID.

3 OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- Analisar o efeito protetor da fusão PspA-PLY contra pneumococos expressando PspA de família 2;
- Avaliar o papel protetor da fusão PspA-PLY contra pneumonia lobar.

Objetivos específicos:

- Avaliar a deposição de complemento em *Streptococcus pneumoniae* expressando PspAs de família 2 na presença de anticorpos contra as proteínas híbridas;
- Avaliar a proteção cruzada induzida pela imunização de camundongos com proteínas híbridas PspA-PID através de desafio sistêmico com pneumococo expressando PspA de família 2;
- Adaptar o modelo de pneumonia lobar pelo desafio nasal com linhagem de pneumococo não letal em camundongos BALB/c, incluindo:
 - Avaliação da cinética da infecção por pneumococo em camundongos “naive” (não imunizados) desafiados pela via nasal;
 - Análise da resposta celular induzida no pulmão (através do infiltrado celular no lavado bronco-alveolar e da produção de citocinas) em camundongos imunizados com vacinas pneumocócicas híbridas, PspA-PID;
- Avaliar a proteção contra pneumonia lobar em camundongos imunizados com vacinas híbridas, PspA-PID;
- Análise da produção de citocinas em animais imunizados com PspA-PID após o desafio em modelo de pneumonia lobar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade São Francisco. Foram utilizados camundongos BALB/C, com idade entre cinco e sete semanas, provenientes do Centro de Bioterismo – UNICAMP. Os animais foram alojados no biotério da Universidade São Francisco e permaneceram por um período de adaptação de no mínimo cinco dias até o início dos experimentos. Durante os experimentos, os animais tiveram livre acesso à água e alimento e permaneceram com um ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas em um número máxima de 5 animais por caixa.

4.2 Proteínas Recombinantes

Os mutantes detoxificados de pneumolisina (pneumolisóides), PID1 e PID2, foram obtidos por mutagênese sítio dirigida através de reações de PCR consecutivas a partir de cultivos de pneumococo, conforme protocolo adaptado de Higuchi *et al.* (1988) e Ho *et al.* (1989). Os genes resultantes foram clonados em vetor de expressão em procariotos, pAE-6xHis, e as proteínas, produzidas em *E. coli* BL21DE3 (Goulart et al., 2013).

Os híbridos foram obtidos pela fusão gênica do fragmento codificante da porção N-terminal de PspA1 (PspA245, Goulart et al, 2011) a vetores pAE contendo os genes mutantes, através de extremidades coesivas obtidas pela digestão com enzimas de restrição apropriadas (Goulart et al., 2013). A **Figura 5** mostra um esquema das proteínas produzidas.

Figura 5. Esquema das proteínas e híbridos utilizados neste estudo. As setas indicam os pontos onde foram inseridas mutações no gene da pneumolisina, para produção dos pneumolisóides PID1 e PID2. As letras A, B e C representam as regiões da molécula de PspA que foram incluídas no fragmento recombinante PspA1.

4.2.1 Expressão e Purificação das proteínas

As proteínas de fusão foram produzidas e purificadas de forma semelhante à descrita para os pneumolisóides. O DNA plasmidial foi previamente expresso em vetor pAE-6xHis.

Para processo de produção das proteínas, 1 µL do DNA plasmidial foi adicionado em microtubos contendo 50 µL de suspensão de *E.coli* BL21DE3, que foram incubadas *overnight* à 37°C. Após esse período as amostras foram inoculadas em placas de meio LB contendo ampicilina e incubadas sob agitação (180rpm), *overnight* à 37°C. Posteriormente, 10 mL do cultivo foi ressuspensionado em 400mL de meio LB contendo ampicilina e novamente incubado sob condições de aerobiose (170rpm, 37°C) até D.O. 0,7. Ao atingir a D.O. desejada, uma alíquota de 1 mL foi retirada e armazenada em freezer à -20°C para posterior análise comparativa em gel SDS-PAGE, enquanto a amostra restante foi adicionado 400 µL de IPTG e incubado por 3 hs sob agitação para a indução da expressão das proteínas. Ao término desse período, mais uma alíquota de 1 mL foi retirada e armazenada em freezer a -20°C para posterior análise comparativa em gel SDS-PAGE. O restante das amostras foram centrifugadas em tubos falcon de 50 mL por 15 minutos à 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado, e os pellets resultantes foram concentrados 10x com Tampão de Equilíbrio (Tris

50mM; NaCl 150 mM, pH 8,0) e armazenados em freezer à -20°C. A extração de proteína das amostras foi realizada após descongelamento e centrifugação a 10000 rpm por 10-15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram ressuspensos em 15 mL de B-PER (Pierce) com 1 µL de DNase (Invitrogen) e incubados por 15 minutos sob agitação, para o processo de extração das proteínas. Posteriormente as amostras foram centrifugadas à 10000 rpm por 20 minutos e os sobrenadantes (fração solúvel) foram separados e armazenados em freezer à -20°C. A fração insolúvel foi extraída dos pellets com a adição de 10 mL de Tampão de Equilíbrio contendo Uréia (4M), centrifuga por 2x a 10000 rpm por 15 minutos. Alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada centrifugação para posterior análise comparativa em gel SDS-PAGE.

As proteínas foram purificadas por cromatografia líquida de afinidade ao níquel. Para tanto as amostras foram diluídas em 25 mL de Tampão de Equilíbrio (Tris 50mM; NaCl 150 mM, pH 8,0) na concentração de 1:1 e filtradas em resinas de Níquel, sob um fluxo de 1-2 mL/min e armazenadas em falcons estéreis. O processo foi repetido por 2 vezes para a obtenção das frações “Flow Through” (FT) e “Lavagem” (LAV). Posteriormente, a coluna foi lavada com Imidazol (200 mM) para a obtenção das eluições contendo as proteínas.

4.2.2 Diálise e Despirogenização das proteínas

Para o uso em vacinas as proteínas foram dialisadas para a retirada do Imidazol (200 mM) e despirogenizadas com Triton X-114 (Sigma), para a retirada de resíduos de LPS contidos na membrana de *E.coli* BL21DE3, utilizadas durante o processo de produção das proteínas.

No processo de diálise, as eluições foram acondicionadas em membranas de diálise e imersas em Tampão de Equilíbrio por 2 horas à 4°C sob agitação.

Para a despirogenização, as proteínas foram ressuspensas em Triton X-114 (Sigma) à uma concentração final de 1% e incubadas à 4°C durante 30 minutos, sob agitação em agitador magnético. Posteriormente, as amostras foram transferidas para banho-maria à 37°C por 10 minutos e centrifugadas logo em seguida à 20000g, 25°C, durante 10 minutos. A fase líquida foi coletada e submetida novamente ao procedimento.

4.3 Avaliação da reatividade cruzada produzida em camundongos imunizados com as proteínas híbridas contra PspA de família 2

Foram utilizados 40 camundongos BALB/C, fêmeas, com idade média entre 5-7 semanas que foram divididos em 8 grupos de 5 animais, de acordo com as proteínas utilizadas para a imunização, conforme descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Grupos experimentais de acordo com as proteínas utilizadas na imunização

Grupos Experimentais	µg/ animal/ dose	Número de animais/Grupo
Alum	50	5
PspA1	5	5
PID1	10	5
PID2	10	5
PspA1+PID1	5+10	5
PspA1+PID2	5+10	5
PspA1-PID1	10	5
PspA1-PID2	10	5

Os animais foram imunizados por via subcutânea em um esquema de 3 doses consecutivas em intervalos de 15 dias, utilizando $\text{Al}(\text{OH})_3$ (50µg/animal/dose) como adjuvante. Dez dias após a última imunização, foi coletado sangue por punção retrorbital, e os soros dos grupos imunizados com as proteínas fusionadas ou co-administradas foram analisados quanto à capacidade de ligação de anticorpos a pneumococos expressando PspA de família 2. Para tanto, isolados de *S pneumoniae* 679/99 (PspA clado 3, família 2) e 3JYP2670 (PspA clado 4, família 2) foram descongelados, semeados em ágar sangue (ProMicro) e incubados a 37 °C durante 16 h em anaerobiose. As colônias foram inoculadas em caldo Todd Hewett (Himedia) acrescido de 20% de extrato de levedura e cultivadas até D.O.600 0,5. Os cultivos foram centrifugados a 8000 g durante 2-4 min e lavados 2 vezes com tampão PBS. As bactérias foram incubadas com 5 a 10% de soro de camundongos imunizados em PBS (volume final de 100 µL por amostra) durante 30 min, lavados e incubados com anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (Sigma) na proporção de 1:1000, por mais 30 min. Após 2 novas lavagens, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 1% e a fluorescência, analisada por citometria de fluxo (FACS) com auxílio do aparelho FACSCANTO (BD Biosciences) do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

4.4 Ensaio de ligação de anticorpos a pneumococos expressando PspA de família 2

Isolados de *S pneumoniae* 679/99 (PspA clado 3, família 2) e 3JYP2670 (PspA clado 4, família 2) foram descongelados, semeados em ágar sangue (ProMicro) e incubados a 37 °C durante 16 h em anaerobiose. As colônias foram inoculadas em caldo Todd Hewett (Himedia) acrescido de 20% de extrato de levedura e cultivadas até D.O.₆₀₀ 0,5. Os cultivos foram centrifugados a 8000 g durante 2-4 min e lavados 2 vezes com tampão PBS. As bactérias foram incubadas com 5 a 10% de soro de camundongos imunizados em PBS (volume final de 100 µL por amostra) durante 30 min, lavados e incubados com anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (Sigma) na proporção de 1:1000, por mais 30 min. Após 2 novas lavagens, as amostras foram fixadas com paraformaldeído 1% e a fluorescência, analisada por citometria de fluxo (FACS) com auxílio do aparelho FACSCANTO (BD Biosciences) do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

4.5 Ensaio de deposição de complemento na superfície de pneumococos expressando PspA de família 2

Os ensaios de deposição de complemento foram realizados conforme protocolo descrito por Darrieux et al. (2008). Isolados de *S pneumoniae* expressando PspAs de família 2 foram cultivados conforme descrito no item 3.5. As amostras foram centrifugadas a 8000 g durante 2-4 min, lavadas 1 vez com tampão PBS, centrifugadas novamente e ressuspensas em tampão opson, consistindo de tampão Hank's (1,26 mM CaCl₂; 0,493 mM MgCl₂; 0,407 mM MgSO₄; 5,33 mM KCl; 0,441 mM KH₂PO₄; 4,17 mM NaHCO₃; 137,93 mM NaCl; 0,338 mM Na₂HPO₄; 5,56 mM dextrose e 0,0266 mM de vermelho fenol) acrescido de 0,1% de gelatina. Às bactérias, foi adicionado 10% de soro de camundongos imunizados – previamente incubado a 56 °C por 30 min para inativação das proteínas do sistema complemento – 10 a 20% de soro em 100 µL finais. Após 30 min a 37 °C foram adicionados 10 µL de soro normal de camundongo (fonte de complemento) e seguiu-se nova incubação. As amostras foram lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com anticorpo anti-C3 de camundongo conjugado a FITC (MP Biochemicals) a 4 °C, no escuro, por 30 min. Após 2 novas lavagens com PBS, as amostras foram ressuspensas em 300 µL de paraformaldeído 1% e a fluorescência, analisada por citometria de fluxo.

4.6 Avaliação da proteção induzida pelas proteínas híbridas contra desafio intravenoso por *S. pneumoniae*

Utilizou-se isolado clínico 3JYP2670 (PS3PspA4), que foi diluído serialmente e cultivado em meio sólido ágar sangue (Neuprov), em anaerobiose durante 16 horas, a 37°C para a determinação de UFC. Após a contagem, as bactérias foram diluídas em solução salina e administradas por via intravenosa na concentração de 10^3 UFCs/animal. O desafio foi realizado 15 dias após a última imunização, e o tempo de sobrevida dos animais, acompanhado ao longo de 10 dias.

4.7 Desenvolvimento do modelo de pneumonia

Foi realizada uma cinética de desafio para o estabelecimento de um modelo de pneumonia. Neste, os animais foram distribuídos em grupos de 10, desafiados e sacrificados após 5 e 7 dias, para a identificação do período onde fosse observado maior número de colônias bacterianas, no lavado e tecido pulmonar, a fim de caracterizar um modelo de pneumonia aguda.

4.7.1 Bactérias

Foram utilizados 2 isolados clínicos das linhagens St 245/00 (sorotipo 14, PspA1) e P854 (sorotipo 19F, PspA1). Os isolados foram diluídos serialmente, plaqueados em meio sólido ágar sangue, e incubados *overnight* à 37°C para a determinação de UFC. Após a contagem das colônias, as bactérias foram diluídas em solução salina e administradas por via nasal na concentração de 5×10^6 UFCs/animal.

4.7.2 Animais e Desafio

Foram utilizados 20 camundongos BALB/C, fêmeas, adultas, que foram divididas em dois grupos. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 200µL de uma mistura de xilazina 0,2% e ketamina 1,0%, e receberam 5×10^6 UFCs diluídos em 50 µL de solução salina, que foram inoculados em uma das narinas com o auxílio de uma micropipeta, com base nos procedimentos descritos por Lima et al.(2012). Após 5 e 7 dias do desafio, 3 animais de cada grupo foram sacrificados, os pulmões coletados e macerados com o auxílio

de um “cell strainer” (BD Biomedicals) em 1 mL de PBS. Alíquotas de 10µL foram diluídas serialmente em PBS e plaqueadas em Agar sangue. Após incubação de 16 horas a 37°C em anaerobiose, o número de UFCs foi calculado em cada grupo. A divisão dos grupos é descrita a seguir (**Tabela 2**).

Tabela 2. Subdivisão dos grupos experimentais

Grupos Experimentais	nº de animais 5 dias após o desafio	nº de animais 7 dias após o desafio
Isolado 245/00	3	3
Isolado P854	3	3

4.8 Cinética do influxo celular no lavado broncoalveolar (BAL) de animais não imunizados após desafio com isolado St 245/00

Foram utilizados 20 camundongos BALB/C, fêmeas, com idade média entre 5-7 semanas, que foram divididas em grupos de seis animais conforme os tempos pré-estabelecidos para a cinética, a saber 0hs, 3hs, 6hs, 12hs, 24hs, 48hs após o desafio. Os animais foram desafiados com isolados clínicos da linhagem St 245/00 e sacrificados por aprofundamento do anestésico (xilazina 0,2% e ketamina 1,0%, em 200µL por animal) por via intraperitoneal, nos diferentes tempos, e tiveram seus BALs coletados para a realização da contagem diferencial.

Para a coleta, um cateter foi inserido na traquéia dos animais, e seus pulmões foram lavados com 0,5 mL de PBS estéril gelado, seguido de lavagem adicional com 1 mL. Ambos os fluídos foram misturados para compor o BAL. Alíquotas de 10 µL de suspensão celular obtidas do BAL de cada animal foram coradas com Cristal violeta e contadas em Câmara de Neubauer para a determinação da concentração de células, e alíquotas de 200 µL contendo 4×10^4 células foram colocadas sobre lâminas e centrifugadas (StatSpin Cytocentrifuge; Iris International, Inc., Chatsworth, CA) durante 4 minutos à 700 rpm. As lâminas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin), e 100 células foram diferencialmente contadas para determinar a infiltração de cada tipo celular.

4.9 Avaliação da resposta celular em animais imunizados após desafio nasal com St 245/00

Foram utilizados 25 camundongos BALB/C, fêmeas, com idade média entre 5-7 semanas que foram divididos em 5 grupos de 5 animais, de acordo com as proteínas utilizadas para a imunização, conforme descrito na **Tabela 3**.

Tabela 3. Grupos experimentais de acordo com as proteínas utilizadas na imunização

Grupos Experimentais	µg/ animal/ dose	Número de animais/Grupo
Alum	50	5
PspA1	5	5
PID1	10	5
PspA1+PID1	5+10	5
PspA1-PID1	10	5

Os animais foram imunizados por via subcutânea em um esquema de 3 doses consecutivas em intervalos de 15 dias, utilizando Al(OH)₃ (50µg/animal/dose) como adjuvante. Após 10 dias datados da última imunização, os animais foram sacrificados 2, 6, 12, 24 e 48 horas após o desafio após desafio intranasal com isolados clínicos das linhagens St 245/00 (sorotipo 14, PspA1) para avaliação da resposta celular. Os grupos tiveram seus BALs e pulmões coletados para a determinação do número de CFUs e infiltrado inflamatório em ambos os compartimentos e para a análise da produção de citocinas no BAL. Para tanto, amostras de BAL coletadas foram alíquotadas para a determinação do número de UFCs e o restante congelados em freezer -80 °C até o momento das análises, enquanto os pulmões coletados tiveram parte das amostras separada para a contagem de colônias bacteriana e outra armazenada em formol 10% à 4 °C para análise histopatológica.

4.9.1 Determinação do número de colônias bacterianas nos pulmões e BAL dos animais após desafio

Após o desafio, os animais foram sacrificados e tiveram seus pulmões e BAL coletados para a determinação do número de colônias bacterianas nos diferentes tempos. Para tanto, os pulmões coletados foram macerados com o auxílio de um “cell strainer” (BD Biomedicals) em 1 mL de PBS. Alíquotas de 10µL do homogenato e BAL desses animais

foram então diluídas serialmente em PBS e plaqueadas em Agar sangue. Após incubação de 16 horas a 37°C em anaerobiose, o número de UFCs foi calculado em cada grupo.

4.9.2 Determinação do número de células totais no BAL em diferentes grupos após desafio

Para a determinação do influxo celular total, alíquotas de 10 µL de suspensão celular obtidas do BAL de cada animal foram coradas com Cristal violeta e contadas em Câmara de Neubauer para a determinação da concentração de células, e alíquotas de 200 µL contendo 4×10^4 células foram colocadas sobre lâminas e centrifugadas (StatSpin Cytocentrifuge; Iris International, Inc., Chatsworth, CA) durante 4 minutos à 700 rpm. As lâminas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin), e 100 células foram diferencialmente contadas para determinar a infiltração de cada tipo celular.

4.9.3 Análise histológica do infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais desafiados com St 245/00

As amostras de pulmão foram coletadas em recipientes contendo formol a 10% tamponado e incubadas por um período de $\pm$ 48 horas. Em seguida, os espécimes foram acondicionados individualmente em recipientes específicos e foram processados na seguinte ordem: Desidratação: cinco banhos de álcool absoluto, de uma hora cada. Diafanização ou clareamento: três banhos de xilol, de uma hora cada. Impregnação: três banhos parafina líquida a uma temperatura prévia de 60 °C, em estufa, de uma hora cada, seguidos pela inclusão do material em cubas de metal com parafina líquida e aguardado a sua total solidificação em temperatura ambiente. Após a solidificação, foram realizados cortes histopatológicos com uma espessura de 5 µm (micras), com o auxílio de um micrótomo rotativo. Em seguida, os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro e incubadas em estufa a 60 °C, até a adesão do material cortado sobre as lâminas. Em seguida realizou-se a coloração através da técnica de Hematoxilina e eosina (H.E). Esta etapa do projeto foi realizada pelo Prof José Aires. Pereira da Universidade São Francisco.

4.9.4 Avaliação da produção de citocinas nos camundongos imunizados após desafio nasal com St 245/00

A produção de citocinas Interleucina-6 (IL-6) e Fator de necrose Tumoral- α (TNF- α) nas amostras de BAL foi determinada por ELISA (Kits Peprtech Inc., Rocky Hill, NJ), conforme especificações do fabricante. Para tanto, microplacas de 96 poços foram incubadas na presença das proteínas diluídas em PBS à concentração de 1 μ g/ml (TNF- α) e 2 μ g/ml (IL-6) *overnight* à temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram incubadas com Tampão de Bloqueio (BSA 1% em PBS) por 1 h em temperatura ambiente e lavadas 4 vezes com tampão PBS-T (0,05% Tween-20 em PBS). Alíquotas de 100 μ L de Padrão ou amostra foram adicionadas às microplacas e incubadas por 2 hs em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas 4 vezes e incubadas com anticorpo de detecção diluído à concentração de 0.25 μ g/ml (TNF- α) e 0.5 μ g/ml (IL-6) por 2 hs em temperatura ambiente. Seguiu-se novas lavagens (4 vezes) e as placas foram então incubadas com anticorpo conjugado (avidina-HPR) diluído em tampão (0.05% Tween-20, 0.1% BSA em PBS) à concentração de 1:2000 e incubadas por 30 min em temperatura ambiente. Após novas lavagens, seguiu-se a adição do substrato ABTS (ABTS Liquid Substrate Solution – Sigma) e a absorbância das amostras, determinada a 405 nm.

4.10 Análise da Proteção conferida pelas proteínas recombinantes contra pneumonia lobar

Simultaneamente aos experimentos de resposta celular, foi desenvolvido um ensaio paralelo para a avaliação do nível de proteção contra pneumonia lobar, conferida pela imunização com as diferentes formulações. Para tanto, dez dias após a última imunização com as proteínas recombinantes, os animais foram anestesiados pela via intraperitoneal com 100 μ L de uma mistura contendo xilasina e ketamina (proporção de 2:1, diluídos em um volume total de 10 mL de solução de solução salina) e 50 μ L de uma suspensão do isolado St 245/00 foram inoculados por via intranasal com os animais suspensos verticalmente. Após o desafio, os camundongos foram observados durante 7 dias, período após o qual foram sacrificados por aprofundamento do anestésico para a coleta dos pulmões. Todo o tecido pulmonar de cada animal foi macerado com auxílio de um Porters em 1mL de PBS estéril gelado. A suspensão foi diluída serialmente, e alíquotas de 10 μ L foram plaqueados em ágar

sangue. O número de UFCs bacterianas foi determinado em cada grupo pela contagem das colônias após 16 horas de incubação a 37 °C em anaerobiose.

4.11 Análise Estatística

A determinação e comparação dos resultados foram realizados utilizando-se o teste de Análise de Variância ANOVA, seguidos do teste Tuckey. As análises foram desenvolvidas com o auxílio do Software GraphPad Prism 5.0 e valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Proteínas Recombinantes

As proteínas PspA1, PID1 e PspA1-PID1 foram expressas em *E.coli* BL21DE3 e purificadas por cromatografia por afinidade ao Níquel, conforme mostra a **Figura 6**.

Figura 6. Imagem das proteínas híbridas em gel SDS-PAGE. A) 245-PID1: Padrão de peso molecular (1); Lavagens (2 a 4); Amostras eluídas com Imidazol 400mM (5 a 8). B) 245-PID2: Padrão de peso molecular (1); Lavagens (2 a 4); Amostras eluídas com Imidazol 400mM (5 a 8).

As proteínas purificadas foram utilizadas na imunização de camundongos BALB/c, e o soro contendo anticorpos específicos, utilizado para as análises funcionais.

5.2 Ensaio de ligação de anticorpos a pneumococos expressando PspA de família 2

A capacidade dos anticorpos contra as proteínas híbridas de ligar-se à superfície de pneumococos foi analisada por citometria de fluxo. Isolados de pneumococo expressando PspAs de família 2 foram incubados na presença de soro dos animais imunizados e anticorpo anti-IgG conjugado com FITC. A **Figura 7** mostra um histograma da fluorescência de bactérias 3JYP2670 após incubação com os diferentes soros. Pode-se observar um aumento da fluorescência nas bactérias incubadas com soro de animais imunizados com as proteínas híbridas, sendo notável ainda que os soros anti PspA1-PID1 apresentam uma intensidade de fluorescência ainda maior que a observada nos soros anti-PspA1-PID2. Os anticorpos contra as proteínas isoladas, PspA, PID1 e PID2 não apresentaram ligação à superfície da bactéria.

Interessantemente, quando as duas proteínas foram administradas em conjunto, os anticorpos induzidos foram capazes de reconhecer e se ligar ao pneumococo, embora com intensidade menor do que os anticorpos contra as proteínas híbridas.

Figura 7. Histograma da ligação de anticorpos à superfície de pneumococo 3JYP2670. Soro de animais imunizados com as diferentes formulações foi analisado quanto à capacidade de ligação à superfície dos isolados 255/00 (expressando PspA 5) e 3JYP2670 (expressando PspA 4). Os números indicam a porcentagem de bactérias fluorescentes em cada grupo.

Uma vez determinada a capacidade dos anticorpos de reconhecer a superfície de *S. pneumoniae*, amostras individuais dos soros foram analisadas quanto à ligação a dois isolados bacterianos, St 255/00 (expressando PspA clado 5) e 3JYP2670 (PspA clado 4). A **Figura 8** mostra a porcentagem de bactérias fluorescentes em cada grupo imunizado. Pode-se observar que os soros de animais imunizados com a proteína híbrida PspA1-PID1 apresentaram capacidade de ligação de anticorpos à superfície bacteriana significativamente superior aos demais grupos em ambos os isolados utilizados.

Figura 8. Ligação de anticorpos ao isolado 3JYP2670. Soro individual de animais imunizados com as diferentes formulações foi adicionado aos cultivos de pneumococo 255/00 (expressando PspA 5) e 3JYP2670 (expressando PspA 4). Os gráficos mostram a porcentagem de bactérias fluorescentes em cada grupo. (* $P < 0,05$).

5.3 Ensaio de deposição de complemento na superfície de pneumococos expressando PspA de família 2

Com base nos resultados obtidos no ensaio de ligação dos anticorpos, foi então avaliada a capacidade de deposição de complemento na superfície de *S. pneumoniae* contendo PspAs de família 2, mediada pelos anticorpos. Amostras de soros de animais imunizados foram avaliadas quanto à capacidade de induzir a deposição de C3 na superfície de 2 isolados bacterianos, St 255/00 (expressando PspA clado 5) e 3JYP2670 (PspA clado 4). O deslocamento dos picos para a direita do gráfico indica um aumento da deposição de complemento na superfície das bactérias. Foi observado maior deslocamento no pico referente aos soros anti PspA1-PID1 em relação ao controle, indicando que este soro induziu uma deposição de complemento superior aos demais nos dois isolados avaliados (**Figura 9**). Os números em cada pico indicam a porcentagem de bactérias positivas, ou seja, bactérias com C3b depositado em sua superfície. Observa-se que, enquanto a incubação com os soros contra as proteínas isoladas não levou a um aumento expressivo na deposição de C3 em relação ao controle (Alum), o soro contendo anticorpos para a proteína híbrida PspA1-PID1 induziu a deposição de complemento na maior parte da população bacteriana. Resultado semelhante foi observado após incubação com soro contra PspA1-PID2 (dados não mostrados).

Figura 9. Histograma da deposição de complemento na superfície de pneumococos em presença de anticorpos. Soro de animais imunizados com as diferentes formulações foi analisado quanto à capacidade de induzir a deposição de C3b nos isolados 255/00 (expressando PspA 5) e 3JYP2670 (expressando PspA 4). Os números indicam a porcentagem de bactérias fluorescentes em cada grupo.

5.4 Avaliação da proteção induzida pelas proteínas híbridas contra desafio intravenoso por *S. pneumoniae*

Uma vez observada a capacidade de reatividade cruzada contra bactérias contendo PspA de família 2, foi então avaliado o nível de proteção oferecido pelas proteínas híbridas através de desafio sistêmico com pneumococo virulento. Animais imunizados foram desafiados por via intravenosa com o isolado 3JYP2670 (PspA clado 4) e observados ao longo de 10 dias. O grupo imunizado com a proteína híbrida PspA1-PLD1 apresentou um período de sobrevida significativamente superior aos demais grupos (**Figura 10**). O grupo apresentou 100% de sobrevivência após desafio, permanecendo vivos mesmo o após término do período de realização do experimento. Durante todo o período de observação pós-desafio esse grupo não aparentou quaisquer sinais físicos de doença. A proteção conferida pela fusão PspA-PID1 foi superior inclusive aquela obtida pelas proteínas co-administradas. Nenhuma outra formulação foi capaz de induzir proteção neste modelo.

Figura 11. Contagem de bactérias em lavado pulmonar de camundongos. Os animais foram desafiados pela via nasal com isolados de pneumococo 245/00 e P854, sacrificados após 5 e 7 dias, e os pulmões coletados para contagem de UFCs.

5.6 Cinética do influxo celular no lavado broncoalveolar (BAL) dos animais após desafio

Uma vez estabelecido o modelo de pneumonia, segue-se então com modelo de análise de resposta celular em animais não imunizados. Para tanto, os animais foram desafiados por via intranasal com o isolado de pneumococo 245/00 e sacrificados em diferentes tempos para a coleta de BAL, conforme os períodos pré-estabelecidos para a cinética. Após a coleta, todos os BAL foram processados e contados diferencialmente quanto à presença de leucócitos nos diferentes tempos. Foi observado que o aumento do influxo celular tem início a partir de 6 horas após o desafio, atingindo níveis significativos de leucócitos totais dentro de um período de 12 horas quando comparado aos encontrados em 3 horas após a infecção. Ainda dentro deste grupo, pode-se observar a predominância significativa de neutrófilos dentro de um período de 12 horas e nos demais avaliados quando comparados aos níveis pré-infecção. O número de macrófagos atinge níveis significativos apenas em 48 horas após a infecção. Não houve alterações significativas no número de linfócitos e eosinófilos nos períodos avaliados (**Figura 12**).

Figura 12. Contagem diferencial do BAL de animais após desafio. Influxo Celular de leucócitos no BAL de animais não imunizados, desafios com isolado clínico St 245/00 em diferentes tempos após infecção ($P < 0.05$ em relação ao tempo 0).

5.7 Proteção contra infecção bacteriana pulmonar em animais imunizados

5.7.1 Cinética bacteriana no BAL e pulmões durante as horas iniciais da infecção

A fim de avaliar os efeitos da imunização sobre o controle da infecção bacteriana nos pulmões, os animais imunizados com as diferentes formulações contendo as proteínas recombinantes, isoladas e fusionadas foram desafiados por via intranasal com 10^7 UFCs do isolado St 245/00, sacrificados em diferentes tempos e tiveram seus BALs coletados para a contagem de colônias bacterianas nos diferentes tempos. As amostras foram plaqueadas em meio ágar sangue e incubadas em estufa à 37°C para a determinação do número de UFCs.

Os resultados observados no BAL dos animais mostram que o grupo imunizado com PspA apresentou uma carga bacteriana significativamente maior em comparação ao grupo não imunizado, entretanto esse número reduziu significativamente após 12 horas quando comparados aos níveis pré infecção e foi aparentado ter sido eliminado completamente dentro de um período de 24 horas. Resultado interessante foi obtido com a imunização com a vacina híbrida que, embora não tenha apresentado resultado significativo em comparação aos demais grupos, mostrou um perfil de controle da infecção semelhante ao observado com PspA e ainda foi capaz controlar a infecção mais rapidamente que este grupo, aparentado ter eliminado

completamente a carga bacteriana dentro de um período de 12 horas. O grupo PID1 também não apresenta alterações significativas entre os diferentes tempos e em comparação aos demais grupos, mas ainda assim semelhantemente ao grupo controle e ao imunizado com PspA, aparentou ter sido capaz de controlar o foco da infecção dentro de um período máximo de 24 horas. (**Figura 13**).

Figura 13. Contagem de colônias bacterianas no BAL. Os animais foram imunizados com diferentes formulações e desafiados por via intranasal após 10 dias a última imunização. O número de UFCs recuperadas pelo plaqueamento do BAL é mostrado nos tempos 2, 6, 12, 24 e 48 horas após o desafio(*) para $P < 0,05$ entre amostras do mesmo grupo nos diferentes tempos; (#) em comparação ao grupo controle (Alum) no mesmo período.

Além do BAL, o sangue de cada animal foi plaqueado para verificar a presença de bacteremia a fim de assegurar a eficácia do modelo deste estudo. Não foi observada a presença de bactérias no sangue de nenhum animal nos tempos avaliados.

5.7.2 Contagem bacteriana nos pulmões após 7 dias de desafio: Proteção

Em um ensaio paralelo aos estudos de cinética, camundongos foram imunizados com as proteínas isoladas, combinadas ou com o híbrido, desafiados por via intranasal com St 245 e observados durante sete dias. Alguns animais apresentaram sinais clínicos de infecção após um a dois dias do desafio, como pêlos eriçados e menor movimentação pelas gaiolas, que

cessaram após cerca de quatro dias. Nenhum animal morreu. Após sete dias do desafio, os animais foram sacrificados e seus pulmões, macerados e plaqueados para contagem de bactérias. Como se trata de um desafio não-fatal, a proteção é dada pela redução no número de bactérias nos pulmões dos animais imunizados em relação ao controle. Foi possível observar uma redução significativa no número de UFCs no grupo vacinado com a proteína híbrida em relação ao controle. No grupo imunizado com PspA, foi observada uma tendência à redução no número de colônias em relação ao controle, porém essa redução não foi significativa (**Figura14**).

Figura 14. Contagem de colônias bacterianas totais no pulmão. Os animais dos diferentes grupos foram avaliados quanto a presença de colônias bacterianas no pulmões sete dias após o desafio ($P < 0.05$ em comparação ao controle Alum).

5.8 Infiltrado celular nos pulmões e Lavado Broncoalveolar (BAL) dos camundongos imunizados com as diferentes formulações

A resposta imune nos pulmões e BAL dos animais imunizados após o desafio intranasal com o isolado St 245/00, foi avaliada através da determinação dos níveis de infiltrado celular total em ambos os compartimentos, em diferentes tempos após a infecção.

5.8.1 Cinética do Infiltrado celular total no BAL dos animais imunizados

Os grupos imunizados também foram avaliados quanto ao infiltrado celular total no BAL. Para tanto, após o desafio, amostras de BAL dos animais foram coletadas para a determinação o influxo celular total em diferentes tempos. Foi observado um aumento tardio

na concentração de células no grupo controle em relação aos grupos imunizados, com pico após 48 horas. A imunização com PspA não induziu uma variação significativa no influxo de células em relação ao controle, em nenhum dos tempos avaliados. Animais vacinados com PID1 apresentaram maior concentração de linfócitos após 24 horas, com uma queda brusca em 48 horas. Em contrapartida, animais imunizados com a vacina híbrida apresentaram aumento significativo no número de células do infiltrado celular total dentro de um período de 12 horas, quando comparado aos demais grupos no mesmo período e em comparação ao mesmo grupo no período anterior. Esse número cai significativamente nas próximas 24 horas. (Figura 15).

Figura 15. Infiltrado celular total no BAL dos animais após o desafio. Após o desafio intranasal com o isolado clínico St 245/00, os animais imunizados com as diferentes formulações tiveram seus BALs coletados e avaliados quanto ao infiltrado total de leucócitos em diferentes períodos após a infecção. (*) para $P < 0,05$ entre amostras do mesmo grupo nos diferentes tempos; (#) em comparação ao grupo controle (Alum) no mesmo período; (o) para comparação entre o híbrido *versus* proteínas isoladas no mesmo período.

5.8.2 Análise histopatológica do infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais imunizados após o desafio

Foi avaliado o infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais dos diferentes grupos, através de análise histopatológica do órgão em diferentes períodos após desafio. Durante as primeiras 12 horas após a infecção, notam-se oscilações no padrão de resposta em todos os grupos. Níveis de infiltração leve foram mais presentes em grupos imunizados com as proteínas, quando comparados ao grupo controle. A condição de infiltração moderada estabeleceu-se em todos os grupos dentro de um período de 24 horas e manteve-se em 48 horas do início da infecção. Nenhum grupo apresentou níveis de infiltrado inflamatório intenso no período analisado (**Quadro 1**).

Quadro 1. Análise do Infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais imunizados após o desafio.

		INFILTRADO INFLAMATÓRIO			
		AUSENTE	LEVE	MODERADO	INTENSO
Alum	2hs				
	6hs				
	12hs				
	24hs				
	48hs				
PspA1	2hs				
	6hs				
	12hs				
	24hs				
	48hs				
PID1	2hs				
	6hs				
	12hs				
	24hs				
	48hs				
PspA1-PID1	2hs				
	6hs				
	12hs				
	24hs				
	48hs				

A **Figura 16** mostra a análise microscópica dos cortes histológicos do lobo esquerdo dos pulmões dos animais corados com H.E. A **Figura 16A** apresenta uma imagem de corte

histológico de pulmão contendo infiltrado inflamatório leve (representados pelos pontos corados em roxo), enquanto a **Figura 16B** apresenta um corte contendo infiltrado inflamatório moderado. Ambas as amostras apresentam sinais de hiperemia (representado pelos pontos corados em rosa).

Figura 16. Imagem de microscopia óptica dos pulmões dos animais imunizados após o desafio. Cortes histológicos de amostras do lobo esquerdo dos pulmões dos animais do grupos PID1 12 horas e Alum 48 horas após infecção por via intranasal com linhagem St 245/00 apresentando sinais de infiltração inflamatória leve (A) e moderado (B), visualizados em aumento de 400X.

5.9 Análise da Produção de citocinas nos animais imunizados após o desafio

Os animais imunizados também foram avaliados quanto à produção de citocinas IL-6 e TNF- α no BAL após desafio em diferentes tempos. Os animais imunizados com o híbrido apresentaram uma produção aumentada de IL-6 após 12 horas, em relação aos grupos injetados com as proteínas isoladas ou o controle. Esta diferença se manteve após 24 horas do desafio, desaparecendo após 7 dias. (**Figura 17**).

Figura 17. Níveis de IL-6 no BAL dos animais após desafio em diferentes tempos. A figura apresenta a produção de IL-6 observados em diferentes tempos após o desafio, nos animais imunizados com as proteínas isoladas ou fusionadas. (*) para $P < 0,05$ em comparação entre amostras do mesmo grupo nos diferentes tempos; (#) em comparação ao grupo controle (Alum) no mesmo período; (o) em comparação com as proteínas isoladas no mesmo período.

Em relação aos níveis de $\text{TNF-}\alpha$, foi observada uma maior produção da citocina após 6 horas nos grupos imunizados com PID1 ou o híbrido, em relação ao grupo controle. Após 12 horas, é possível observar um aumento na secreção de TNF em todos os grupos, com exceção de PID1, que manteve níveis semelhantes aos observados com 6 horas do desafio. Após 24 horas, houve uma redução significativa na produção de TNF em todos os grupos, não sendo possível detectar a citocina após 7 dias do desafio (**Figura 18**).

Figura 18. Níveis de secreção de TNF- α no BAL dos animais após desafio em diferentes tempos.

A Figura apresenta a produção de IL-6 observados em diferentes tempos após o desafio, nos animais imunizados com as proteínas isoladas ou fusionadas. (*) para $P < 0,05$ em comparação entre amostras do mesmo grupo nos diferentes tempos; (#) em comparação ao grupo controle (Alum) no mesmo período; (o) em comparação ao grupo PspA no mesmo período.

6 DISCUSSÃO

Diversas proteínas pneumocócicas têm sido estudadas como potenciais candidatas no desenvolvimento de vacinas alternativas contra *S. pneumoniae*, com custo de produção menor e cobertura vacinal mais ampla do que as atuais formulações baseadas em polissacarídeos. Dentre estas, PspA e PLY tem apresentado resultados promissores em diferentes modelos, tendo inclusive progredido a ensaios clínicos (Briles et al., 2000; Briles et al., 2003; Ogunniyi et al., 2000; Ogunniyi et al., 2007). A principal limitação destas proteínas, no entanto, tem sido a baixa imunogenicidade de cada proteína isolada e, no caso de PspA, a elevada variabilidade estrutural e sorológica, levantando dúvidas com relação à eficácia protetora destes antígenos em humanos.

Dados de isolados obtidos em diversas partes do mundo mostram que mais de 90% dos isolados expressam PspA pertencentes às famílias 1 e 2 (Briles, et al., 2000). Essas famílias de PspA são subdivididas em clados, sendo a PspA de família 1 representada por dois clados (clados 1 e 2), e a PspA de família 2 em 3 clados (clados 3, 4 e 5). Estudos relativos à reatividade cruzada entre PspAs têm demonstrado resultados variáveis. Foi observado em humanos, que a vacinação com uma PspA recombinante derivada da linhagem Rx1 (família1, clado2), induz uma ampla resposta de anticorpos com reatividade cruzada para uma grande variedade de proteínas PspA (Baril et al., 2006). Este resultado pode ser explicado pela presença de anticorpos naturais contra pspA nos indivíduos imunizados, tendo a vacinação servido como um “booster” para anticorpos que haviam sido produzidos em resposta à colonização ao longo da vida. Em geral, a reatividade cruzada se restringe a PspAs da mesma família, limitando a amplitude de proteção em formulações baseadas nesta proteína. Estudos mostram que moléculas de PspAs de famílias diferentes induzem anticorpos com capacidades distintas de reconhecimento de moléculas heterólogas (Darrieux et al, 2008; Moreno et al, 2010). Essa variabilidade no reconhecimento também pode ser observada em proteínas do mesmo clado, como demonstrado em um estudo de variabilidade entre PspAs de família 1 que identificou dois fragmentos recombinantes, PspA245 e PspA94, capazes de induzir anticorpos com ampla reatividade cruzada dentro desta família (Goulart et al., 2011). Tem sido sugerido que a combinação de 3 antígenos de PspA, sendo um pertencente à família1 (clado 2) e dois da família 2 (clados 3 e 4) poderiam induzir proteção contra uma ampla variedade de isolados de *S. pneumoniae*.

Outra alternativa seria a combinação de PspA a outras proteínas imunogênicas do pneumococo, capazes de ativar mecanismos imunológicos distintos, atuando sinergisticamente na indução de imunidade protetora.

PLY é uma toxina com diversas funções biológicas importantes, sendo capaz de ligar-se diretamente ao TLR-4, dessa forma ativando mecanismos da imunidade inata. Embora tenha se mostrado imunogênica em modelos animais, possui alta toxicidade quando se apresenta em sua conformação original, portanto, sua utilização como componente vacinal deve necessariamente incluir a produção de formas detoxificadas, que mantenham as características imunogênicas, sem causar a lise celular.

Diversos estudos na literatura mostram o potencial imunogênico dos fragmentos e protetor PspA e PLY isolados (Briles et al, 2003; Ogunniyi et al., 2000; Ogunniyi et al., 2007). Em particular, a combinação entre PspA e formas detoxificadas tem se mostrado altamente protetora em modelos animais (Briles et al, 2003, Ogunniyi et al., 2007).

Com base nestes resultados, o presente propôs a avaliação da indução de proteção cruzada por formulações contendo PspA e PIDs fusionadas. Foram produzidas duas proteínas híbridas a partir da fusão de fragmentos recombinantes de PspA245 (clado 1) a dois mutantes atenuados de PLY, PID1 (com uma mutação), e PID2 (2 mutações). As proteínas foram utilizadas na imunização de camundongos e os anticorpos induzidos analisados quanto à capacidade de reconhecer e ligar-se a diferentes isolados de pneumococos vivos expressando PspAs de família 2. Os resultados mostram que anticorpos presentes nos soros de animais imunizados com os híbridos apresentaram maior capacidade de ligação aos pneumococos intactos de diferentes sorotipos, contendo PspAs da família 2. Este resultado pode ser devido a uma maior exposição de epitopos imunogênicos de PspA após a fusão com PID, levando a uma maior interação dos anticorpos induzidos com as proteínas da superfície bacteriana. O mesmo não pode ser observado em relação aos anticorpos contra os pneumolisóides, os quais não apresentaram ligação aos isolados. Este resultado já havia sido observado por nosso grupo em ensaios com pneumococos expressando PspAs de família 1 (Goulart et al, 2012). Soro anti-PspA também não foi capaz de se ligar a estes isolados que expressam PspAs de família 2, um resultado que já foi observado em outros estudos (Darrieux et al., 2007; Moreno et al., 2010). Interessantemente, anticorpos contra as misturas PspA + PID também reconheceram a superfície do pneumococo, reforçando, dessa forma a maior eficácia da combinação entre proteínas diferentes na indução de respostas imunes mais amplas. Esses resultados em conjunto sugerem que a imunização com a vacina híbrida estimula a produção de anticorpos com maior capacidade de reconhecimento e ligação à superfície bacteriana,

favorecendo ainda a otimização da deposição de complemento e aumentando as chances de eliminação bacteriana pelo processo de fagocitose.

A PspA está envolvida em diferentes etapas da patogênese da bactéria (Frolet et al., 2010; Kadioglu et al., 2008; Price & Camilli 2009; Yoo et al., 2010) e desempenha um papel crucial na produção de anticorpos opsonizantes, capazes de induzir a deposição de proteínas do sistema complemento, com consequente fagocitose da bactéria. Essa propriedade de deposição de complemento na superfície bacteriana também pode ser observada em estudo com PLV, como demonstrado por Balachandran et al., (2001). Assim, devido ao papel central do complemento na imunidade contra pneumococos, foi avaliada a capacidade dos anticorpos de promover a deposição de C3b na superfície das bactérias contendo PspA da família 2. De forma semelhante ao observado com os ensaios de ligação, anticorpos contra os híbridos induziram uma maior deposição de complemento na superfície bacteriana, em comparação aos demais grupos. Novamente, anticorpos contra PspA isolada não foram capazes de ativar a deposição de complemento nas bactérias expressando PspAs heterólogas, um resultado que já foi observado em outros estudos (Darrieux et al, 2007; Moreno et al, 2010). A proteção conferida pelas proteínas de fusão foi avaliada através do desafio intravenoso dos animais imunizados; este modelo de desafio já foi proposto em outros estudos e visa otimizar a interação da bactéria com os componentes do complemento na corrente sanguínea. Neste modelo, apenas os camundongos imunizados com o híbrido PspA1-PID1 foram protegidos do desafio sistêmico com pneumococo expressando PspA de família 2, sugerindo que a presença de dois antígenos, PspA e PID, pode ampliar os efeitos protetores da vacina contra bactérias que expressam PspAs diferentes da incluída na formulação. O híbrido PspA1-PID2 não foi protetor neste modelo, sugerindo que a presença de mais de uma mutação no pneumolisóide pode ser deletéria para a eficácia da vacina. Também, uma vez que os animais imunizados com as proteínas combinadas não foram protegidos, é possível que a fusão entre PspA e PID1 promova algum tipo de alteração que permita uma maior exposição de epitopos protetores na molécula final. Em conjunto, os resultados sugerem que a formulação baseada na fusão de PspA1 e PID1 é capaz de ampliar a cobertura protetora para isolados de pneumococo expressando PspAs distintas, e que a deposição de complemento pode ser o mecanismo envolvido na destruição bacteriana por fagocitose.

Devido ao potencial adjuvante dos pneumolisóides, sugerido por sua capacidade de interagir com receptores da imunidade inata, a investigação de outros mecanismos imunológicos, como a produção de citocinas, pode fornecer resultados importantes para a elucidar a resposta induzida por estas vacinas. Devido ao papel central de PLV durante a

pneumonia, este modelo foi escolhido para investigação da contribuição da resposta celular na proteção induzida pela fusão PspA-PID1.

Para o desenvolvimento desse novo modelo, os animais foram desafiados por via intranasal com duas diferentes linhagens de pneumococo e foram sacrificados nos períodos de 5 e 7 dias após desafio, para observação do processo de colonização e determinação do número de UFCs nos diferentes períodos. Após 5 dias do desafio já pode ser observado colonização nos pulmões dos animais de ambos os grupos e esse processo mostra-se bastante intenso ao longo de 7 dias. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Briles et al., (2003), para o desenvolvimento de um modelo de pneumonia em que o autor observa um maior número de UFCs entre 7 e 11 dias após o desafio intranasal com pneumococo, caracterizando um modelo de pneumonia aguda com base em achados histológicos dos pulmões desses animais. Uma vez que foram obtidos melhores resultados com a linhagem st 245/00, esta bactéria foi utilizada para a avaliação do modelo de pneumonia, bem como a proteção induzida pela vacinação neste modelo.

Após o estabelecimento do modelo, um novo grupo de animais não imunizados foram desafiados por via intranasal com o isolado St 245/00 e avaliados quanto ao perfil de resposta celular local através do influxo celular no BAL em diferentes tempos. Foi observado aumento significativo de leucócitos totais, com predomínio de neutrófilos a partir de 12 horas do início da infecção, acompanhado de aumento de macrófagos 48 horas após o início da infecção. Estes resultados podem ser relacionados à presença de PLY e PspA na parede celular e superfície da bactéria, respectivamente, uma vez que estudos anteriores utilizando-se destas proteínas isoladamente ou combinadas, mostraram a sua eficácia no recrutamento de leucócitos, principalmente neutrófilos, e macrófagos (Briles et al, 2003; McNeela et al, 2010; Lima et al, 2012).

A aspiração de pneumococo para o pulmão desencadeia uma intensa reação inflamatória local e sistêmica devido a toxicidade que a bactéria manifesta em ambos os compartimentos. Nos pulmões, a infiltração leucocitária é característica marcante da infecção por pneumococo, apresentando influxo celular significativo dentro de poucas horas. Além disso, o recrutamento de neutrófilos e macrófagos também pode estar relacionado à ativação do sistema complemento, uma vez que esse exerce papel central na imunidade contra pneumococos e pode ser o mecanismo principal na destruição bacteriana por fagocitose (Madsen et al., 2000). Gordon et al (1986) mostra essa relação ao cultivar neutrófilos com soro humano, e observar o processo de fagocitose através do bloqueio de receptores CR1 e CR3 de complemento com o uso de anticorpo de monoclonais. O autor observou que o

bloqueio de receptores de complemento CR3 de neutrófilos diminuiu de 50 à 80% a fagocitose de pneumococos sorotipo 6A e 14.

A fim de se avaliar a eficácia da vacina sobre controle da infecção pneumocócica no modelo de pneumonia lobar, foram conduzidos dois ensaios paralelos para observar o controle da infecção bacteriana nos pulmões ao longo de um período pré estabelecido, e a proteção conferida pelas vacinas contra a pneumonia lobar, respectivamente. Para tanto, no modelo utilizado para a cinética da infecção, os animais imunizados com as diferentes formulações, foram desafiados pela via intranasal com o isolado St 245/00 e tiveram seus pulmões coletados para a determinação contagem bacteriana em diferentes tempos após o desafio. Foi observado, em um primeiro momento, que os pulmões dos animais imunizados com PspA apresentaram uma carga bacteriana significativamente maior que o grupo controle. Posteriormente, no entanto, esse número reduziu gradativa e significativamente dentro de um período de 12 horas, aparentando ter eliminado completamente a infecção em 24 horas. Interessantemente, o grupo imunizado com a vacina híbrida apresentou comportamento semelhante ao da PspA com resultados ainda mais eficazes, aparentando ter eliminado completamente a infecção dentro um período máximo de 12 horas. O grupo imunizados com PID1 eo grupo controle apresentaram perfis semelhantes, com uma baixa carga bacteriana inicial, que aumenta nas 6 horas seguintes e torna a reduzir significativamente em 12 horas, aparentando ter eliminado completamente a infecção dentro de um período de 24 horas. Embora esses resultados sugiram um controle da infecção em todos os grupos após 24 horas do desafio, quando observa-se os resultados obtidos no ensaio de proteção contra pneumonia lobar, onde os animais foram imunizados e desafiados da mesma maneira que no ensaio descrito anteriormente, e sacrificados apenas 7 dias após a infecção para a contagem de colônias nos pulmões do diferentes grupos, notamos que somente o grupo imunizado com a fusão PspA1-PID1 apresentou uma carga bacteriana significativamente menor quando comparado ao grupo controle. Esses resultados em conjunto nos sugerem que o número de bactérias é reduzido drasticamente nas primeiras horas de infecção, provavelmente por mecanismos de imunidade inata, para então ser iniciado um processo gradativo de colonização pulmonar pelos pneumococos sobreviventes.

Resultados similares foram descritos por Briles et al. (2003) em modelo de pneumonia lobar, no qual animais imunizados com uma mistura contendo PspA e pneumolisóide apresentaram uma carga bacteriana significativamente menor em seus pulmões após sete dias do desafio intranasal com isolado St EF3030 (sorotipo 19), quando comparado aos grupos imunizados com as proteínas isoladamente e se mostrou protetora em modelo de pneumonia.

O autor propõe um efeito sinérgico entre as duas proteínas, sugerindo que a PspA é capaz de promover a ativação do complemento, enquanto o pneumolisóide teria uma atividade complementar de promover a fixação deste na superfície bacteriana favorecendo a atuação do mecanismo de resposta celular no processo de fagocitose.

De forma semelhante, Ogunniyi et al. (2007) ao avaliar a contribuição de PspA, PspC e PLY para a patogenicidade de D39 em camundongos, observou durante infecção pulmonar que animais desafiados por via intranasal com um mutante duplo PspA⁻PLY⁻, apresentaram número de UFCs nos pulmões significativamente menores ao final de sete dias quando comparado ao grupo desafiado com linhagem D39 nativa. O autor atribui grande parte dos efeitos observados no controle da infecção pulmonar à presença da mutação no gene de PLY. A hipótese sugerida pelo autor corrobora os dados obtidos por Wu et al. (2010) o qual observou que a imunização com misturas contendo PLY recombinante foi capaz de proteger camundongos contra colonização pulmonar após desafio intranasal com sorotipos 14, 19 e 23F.

Em relação ao perfil de citocinas, nossos resultados mostram um rápido aumento da secreção de TNF- α nas primeiras 6 horas após a infecção em comparação ao grupo não imunizado e estes níveis aumentam expressivamente após 12 horas. Uma vez que a indução da secreção de TNF- α por PspA e PLY já foi descrita, a proteção observada no desafio com pneumococo também pode ser atribuída a esta citocina, uma vez que TNF- α está envolvida no recrutamento de neutrófilos e macrófagos nos pulmões de animais infectados com pneumococo (Jones et al., 2005; McNeela et al., 2010; Taut et al. 2008). A elevação rápida dos níveis de TNF- α nas vias aéreas também foi observada por Ker et al (2002) em resposta à infecção pneumocócica, e está implicada no controle do “turnover” de macrófagos através do estímulo da fagocitose de macrófagos alveolares apoptóticos por macrófagos resilientes no pulmão. Este mecanismo contribui para o controle da resposta inflamatória e diminui o risco de progressão da pneumonia pneumocócica para a doença invasiva (Fadok et al., 1998; Marriott et al., 2006).

Resultado semelhante pode ser observado para a secreção de IL-6, que se mostrou significativamente elevada dentro de um período de 12 horas após a infecção, tornando a diminuir para níveis pré-infecção em 48 horas. Esses dados nos permitem sugerir que um aumento precoce dos níveis desta citocina pode ser crucial para o controle da infecção pneumocócica. Estes achados corroboram com os obtidos por Lima et al. (2012) que ao avaliar níveis dessa citocina em animais imunizados com um fragmento de PspA em presença de um adjuvante forte, observou aumento significativo nos níveis dessa citocina em

comparação com animais imunizados. Quando se observa o resultado dos níveis significativamente aumentados de IL-6 nos períodos de 12 e 24 horas após a infecção, nota-se que este é ainda mais expressivo do que os obtidos por Lima et al. (2012), e pode possivelmente estar relacionado à fusão com PLY, como demonstrado em outros trabalhos onde foram observados aumento no estímulo de liberação de IL-6 acompanhada de recrutamento de neutrófilos para o local da infecção em presença desta proteína (Rijneveld et al., 2002; Kirkham et al., 2006). No entanto, por se tratar do uso de uma forma detoxificada de PLY, os efeitos exercidos sobre esses mecanismos desenvolvem-se de forma controlada culminando em efeito protetor para integridade pulmonar.

Além disso, o rápido retorno desta citocina a níveis pré-infecção nos animais imunizados, dentro de um período máximo de 48 horas pode estar relacionado ao controle da inflamação como observado por Lima et al. (2012), e à preservação da integridade no tecido pulmonar, como sugerido por Salha et al. (2011), que encontra resultados interessantes ao avaliar os efeitos da PLY sobre a infecção pneumocócica e injúria pulmonar em camundongos imunizados com formas detoxificadas de PLY. A autora observa que os animais imunizados foram protegidos contra danos pulmonares e risco morte após desafio intranasal letal com doses de PLY nativa purificada, e postula que o controle do dano ao tecido pulmonar dos animais pode estar relacionado à redução dos níveis de IL-6 obtidos no soro dos animais imunizados em comparação aos não imunizados dentro de um período médio de 24 horas. Interessantemente, ao observarmos as imagens dos cortes histológicos dos pulmões dos diferentes grupos por microscopia óptica, pudemos observar claramente este efeito (dados não mostrados) em comparação ao grupo não imunizado, fato que justifica a escolha da imagem no trabalho para exemplificação dos diferentes níveis de infiltrado inflamatório nos pulmões dos animais.

Ao avaliar o infiltrado celular, nos diferentes grupos, pode-se um aumento significativo no número de células no grupo imunizados com PspA dentro de um período de 12 horas quando comparado ao grupo salina. Adicionalmente, nos grupos imunizados com PLD1 e a proteína híbrida, também foi possível observar aumento significativo no número de células, dentro de um período máximo de 6 e 12 horas, respectivamente. Esses resultados foram semelhantes aos descritos por Lima et al (2012) onde também foi observado aumento significativo do infiltrado celular total no BAL de animais imunizados com formulação conjugada contendo PspA em comparação ao grupo não imunizado, dentro de um período 12 horas após infecção. Estes resultados corroboram com os obtidos por McNeela (2010) que atribui o aumento do número de células, à presença da PLY.

O mecanismo de fagocitose mediado por neutrófilos e macrófagos no processo de redução da carga bacteriana durante a pneumonia pneumocócica já é bem caracterizado. Briles também demonstrou esses resultados em análise histopatológica de pulmões, durante o desenvolvimento de um modelo de pneumonia aguda onde observou, após desafio por via intranasal com sorotipo 19, que os alvéolos pulmonares dos animais infectados apresentavam principalmente neutrófilos e macrófagos além de presença de hiperemia.

A PLV desempenha papel importante na progressão da infecção pneumocócica, como mostrado em estudo anteriores, como Maus et al. (2004) que, após ministrar PLV recombinante em pulmões de camundongos previamente depletados de macrófagos alveolares, observou que a ausência deste causou edema pulmonar severo. Já Malley et al. (2003) demonstrou em outro estudo, que a PLV pode atuar como um clássico Padrão Molecular Associado ao Patógeno (PAMP) via sinalização por TLR-4, induzindo liberação de TNF- α por macrófagos alveolares e subsequente recrutamento de neutrófilos após desafio pulmonar com pneumococo.

Além disso, os macrófagos desempenham um importante papel durante a infecção pneumocócica no processo de reparo do tecido pulmonar através da remoção de neutrófilos apoptóticos do local da infecção (Knapp et al., 2003).

Em suma, nossos resultados conjuntamente possibilitam demonstrar a importância do uso das proteínas de fusão na otimização do estímulo da resposta celular, bem como em mecanismos que medeiam o desencadeamento dessa resposta, como a produção de anticorpos com maior capacidade de reconhecimento e ligação à superfície bacteriana e aumento da deposição de complemento. Além disso, pudemos observar que o estabelecimento de uma resposta celular precoce, dentro de um período máximo de 12 horas foi crucial para o controle da infecção pneumocócica em nosso modelo.

Adicionalmente, nossos dados em conjunto sugerem que a fusão de PspA com PID1 apresentaram efeitos sinérgicos como sugerido por Biles et al. (2003), possivelmente através da ativação do complemento e eliminação bacteriana por fagocitose mediada principalmente por neutrófilos.

A PspA demonstrou ter implicação importante na ativação do complemento através dos resultados obtidos em nosso modelo de infecção sistêmica, corroborando achados de estudos anteriores. Adicionalmente, a presença do pneumolisóide PID1 na formulação, aparentou ter maior participação no controle da pneumonia, como observado em nossos resultados, possivelmente através do desencadeamento de mecanismos de resposta celular induzida por meio do recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção e

estímulo de liberação de citocinas, como sugerido em trabalhos anteriores com o uso desta proteína. Finalmente, nossos resultados em comunhão com dados já obtidos por outros trabalhos descritos, nos permitem reforçar, portanto, o uso sugestivo da formulação contendo PspA1-PID1 contra pneumonia por *S. pneumoniae* e para a ampliação da cobertura vacinal no combate às infecções pneumocócicas.

7 CONCLUSÃO

- A imunização de camundongos com proteínas híbridas PspA-PID induziu a produção de anticorpos com baixa reatividade contra PspAs recombinantes de família 2;
- Os anticorpos contra as proteínas híbridas foram capazes de se ligar e promover a deposição de complemento na superfície de pneumococos expressando PspAs de família 2;
- Camundongos imunizados com a fusão PspA1-PID1 foram protegidos do desafio intravenoso com um isolado virulento de pneumococo;
- Após o desafio nasal não letal com isolados de pneumococo, as bactérias St 245/00 mostraram-se mais eficazes em colonizar o pulmão, tendo sido a cepa selecionada para o uso em modelo de pneumonia lobar.
- A formulação contendo PspA1-PID1 foi capaz de controlar a infecção pneumocócica através da indução precoce de citocinas como IL-6 e TNF- α nos pulmões, bem como no recrutamento de leucócitos para o local da infecção em modelo de pneumonia lobar.
- A fusão PspA1-PID1 foi capaz de ampliar a cobertura protetora a isolados expressando PspAs distintas e também de proteger os animais contra pneumonia.

REFERÊNCIAS*

- Appelbaum PC. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. Clin Infect Dis. 2002; 34: 1613-20.
- Arulanandam BP, Lynch JM, Briles DE, Hollingshead S, Metzger DW. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A and interleukin-12 augments antibody-mediated opsonization and protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. Infect Immun., 2001;69(11):6718-24.
- Balachandran P, Hollingshead SK, Paton JC, Briles DE. . The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing Pneumolysin. J Bact. 2001; 3108–16
- Baril L, Dietemann J, Essevaz-Roulet M, Béniguel L, Coan P, Briles DE, Guy B Cozon G. Pneumococcal surface protein A (PspA) is effective at eliciting T cellmediated responses during invasive pneumococcal disease in adults. Clin Exp Immun. 2006; 145: 277–86.
- Barocchi MA, Censini S, Rappuoli R. “Vaccines in the era of genomics: The pneumococcal challenge”, Vaccine. 2007; 25: 2963–73.
- Berry AM, Alexander JE, Mitchell TJ, Andrew PW, Hansman D, Paton JC. Effect of defined point mutations in pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 1995; 63:1969-1974.
- Berry AM, Yother J, Briles DE, Hansman D and Paton JC. Reduced Virulence of a Defined Pneumolysin-Negative Mutant of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 1989; 2037-2042.
- Bhakdi, S., and J. Trantum-Jensen. Damage to cell membranes by poreforming bacterial cytolysins. Prog Allergy. 1988; 40:1-43.
- Braido F, Bellotti M, Maria AD *et al.* The role of Pneumococcal Vaccine. Pulmonary Pharm Therapeutics. 2008; 21:608– 615.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Proposta para Introdução da vacina Pneumocócica 10-Valente (Conjugada) no Calendário Básico de Vacinação da Criança. Brasília, 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/intro_pneumococica10_val_04_02_10_ver_final.pdf. [Acesso em: 06 Dez. 2013].

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, van Ginkel FW, and Benjamin Jr WH. 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.

Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, Ferguson LM, Nahm MH, and Nabors GS. Immunization of humans with rPspA elicits antibodies, which passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. J Infect Dis. 2000; 182:1694-1701.

Bogaert D, de Groot R, Hermans PWM. *S. pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. Lanc Infect Dis. 2004; 4:144-54.

CDC. Center for disease control and prevention. Disponível em: www.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-2/pneumococcal-disease.aspx. [Acesso em: 06 Dez. 2013]

Cruvinel WM, Mesquita Júnior D, Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, et al . Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. Rev Bras Reumatol. 2010; 50(4): 434-47.

Darrieux M, Miyaji EN, Ferreira DM, Lopes LM, Lopes APY, Ren B, Briles DE, Hollingshead SK, Leite LCC. Fusion proteins containing Family 1 and 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that correlates with antibody-mediated enhancement of complement deposition. Infect Immun. 2007; 75 (12): 5930-38.

Fadok, V.A., D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, and P.M. Henson. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/ paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, PAF. J Clin Invest. 1998; 101:890–98.

García-Suárez MM, Vázquez F, Méndez FJ. “*Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: an update”, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2006; 512-17.

Gilbert RJC, Jiménez J, Chen S, Tickle IJ, Rossjohn J, Parker M, Andrew P, Saibil HR. Cell. 1999; 97: 647-55.

Gordon DL, Johnson GM, Hostetter MK. Ligand-receptor interactions in the phagocytosis of virulent *Streptococcus pneumoniae* by polymorphonuclear leukocytes. J Infect Dis. 1986; 154(4):619-26.

Goulart C; Silva TRd; Rodriguez D; Politano WR; Leite LCC; Darrieux M. Characterization of Protective Immune Responses Induced by Pneumococcal Surface Protein A in Fusion with Pneumolysin Derivatives. PLoS ONE. 2013; 8(3): e59605.

Goulart C, Darrieux M, Rodriguez D, Pimenta FC, Brandileone MCC, Andrade AL, Leite LCC. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-

reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. *Vaccine*. 2011; 29:1634–42.

Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, and Rohde M. Illustration of Pneumococcal Polysaccharide Capsule during Adherence and Invasion of Epithelial Cells. *Infect Immun*. 2005; 73(8): 4653–4667

Homma A, Martins RM, Leal MLF, Freire MS, Couto AR. Atualização em vacinas, imunizações e inovação tecnológica. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2011; 16(2): 445-58.

Instituto Adolf Lutz - IAL. Apêndice 11. Bacteriologia de *S. pneumoniae*. Instituto Adolf Lutz, São Paulo, 2010.

Jones MR, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Lung NF- κ B activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. *J Immunol*, 2005; 175: 7530–7535.

Jourdain S, Drèze PA, Vandeven J, Verhaegen J, Van Melderen L and Smeesters PR. Sequential multiplex PCR assay for determining capsular serotypes of colonizing *S. pneumoniae*. *BMC Infect Dis*. 2011; 11:100.

Kadioglu A *et al.* The Role of *Streptococcus pneumoniae* Virulence Factors in Host Respiratory Colonization and Disease. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6: 288-301.

Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, van Rooijen N, van der Poll T. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167:171–79.

Madsen M, Lebenthal Y, Cheng Q, Smith BL, Hostetter MK. A Pneumococcal Protein That Elicits Interleukin-8 from Pulmonary Epithelial Cells. *J Infect Dis*. 2000;181:1330–6.

Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. Recognition of pneumolysin by toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:1966–71.

Marriott, H.M., P.G. Hellewell, S.S. Cross, P.G. Ince, M.K. Whyte, D.H. Dockrell. Decreased alveolar macrophage apoptosis is associated with increased pulmonary inflammation in a murine model of pneumococcal pneumonia. *J Immunol*. 2006; 177:6480–88.

Maus UA, Srivastava M, Paton JC, Mack M, Everhart MB, Blackwell TS, Christman JW, Schlondorff D, Seeger W, Lohmeyer J. Pneumolysin- induced lung injury is independent of leukocyte trafficking into the alveolar space. *J Immunol*. 2004;173:1307–12.

Marqués JM, Rial A, Muñoz N, Pellay FX, Van Maele L, Léger H, Camou T, Sirard JC, Benecke A, Chabalgoity JÁ. Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- γ -mediated immunity. *Immunobiology*. 2012; 420– 29.

McNeela EA, Burke A , Neill DR, Baxter C, Fernandes VE, et al. Pneumolysin Activates the NLRP3 Inflammasome and Promotes Proinflammatory Cytokines Independently of TLR4. *PLoS Pathog*, 2010; 6(11): e1001191.

Mesquita Júnior D, Cruvinel WM, , Araújo JAP, Catelan TTT, Souza AWS, Silva NP, *et al*. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev Bras Reumatol.*,2010; 50(4): 434-47.

Miyagi EN, Oliveira MLS, Carvalho E, Ho PL. Serotype-independent Pneumococcal Vaccines. *Cell Mol Life Sci.*, 2013;70(18):3303-26.

Moreno AT, Oliveira ML, Ferreira DM, Ho PL, Darrieux M, Leite LC. 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; 439–46.

Nakamura M, Sekino-Suzuki N, Mitsui K, Ohno-Iwashita Y. Contribution of tryptophan residues to the structural changes in perfringolysin O during interaction with liposomal membranes. *J Biochem.*, 1998; 123, 1145–55.

Nelson S, Summer WR. Innate Immunity, Cytokines, And Pulmonary Host Defense. *Infect Dis Clin North Am*. 1998; 12(3): 555-67.

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

Ogunniyi AD, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, and Paton JC. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. 2000; 68:3028-33.

Park S & Nahm MH. Older Adults Have a Low Capacity To Opsonize Pneumococci Due to Low IgM Antibody Response to Pneumococcal Vaccinations. *Infect Immun*. 2011;79(1):314–20.

Paton JC. The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of *streptococcus pneumoniae*. *Trends Microbiol*. 1996;4:103–6.

Paton JC, Lock RA, Lee CJ. Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. *Infect Immun*. 1991; 59: 2297–2304.

Pletz MW, Maus U, Krug N, *et al*. Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *Int J Antimicrobial Agents*. 2008; 32(3):199-206.

Kerr AR, et al. 2002. Role of inflammatory mediators in resistance and susceptibility to pneumococcal infection. *Infect Immun*. 2002; 70:1547–57.

Kirkham LA, Kerr AR, Douce GR, Paterson GK, Dilts DA, Liu DF, Mitchell TJ. Construction and immunological characterization of a novel nontoxic protective pneumolysin mutant for use in future pneumococcal vaccines. *Infect Immun*. 2006;74(1):586-93.

Rijneveld AW, van den Dobbelsteen GP, Florquin S, Standiford TJ, Speelman P, van Alphen L, van der Poll T. Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *J Infect Dis*. 2002;185(1):123-6.

Rosjohn J, Feil SC, McKinstry WJ, Tweten RK, Parker MW. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell*. 1997; 89: 685–92.

Rossoni AMO, Costa LMD, Berto DB, Farah SS, Gelain M, Brandileone MCC, Ramos VHM, Almeida SM. Acute bacterial meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* resistant to the antimicrobial agents and their serotypes. *Arq Neuropsiquiatr*. 2008; 66:509-15.

Salha D, Szeto J, Myers L, Claus C, Sheung A, Tang M, Ljutic B, Hanwell D, Ogilvie K, Ming M, Messham B, van den Dobbelsteen G, Hopfer R, Ochs MM, Gallichan S. Neutralizing antibodies elicited by a novel detoxified pneumolysin derivative, PlyD1, provide protection against both pneumococcal infection and lung injury. *Infect Immun*. 2012;80(6):2212-20.

Saunders FK, Mitchell TJ, Walker JA, Andrew PW, Boulnois GJ. Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for in vitro activity. *Infect Immun*, 1989; 57:2547–2552.

Standiford TJ, Kunkel SL, Greenberger MJ, Laichalk LL, Strieter RM. Expression And Regulation Of Chemokines In Bacterial Pneumonia. *J Leukoc Biol*. 1996; 59: 24-28.

Tilley S, Orlova E, Gilbert R, Andrew P, Saibil H. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell*. 2005; 121, 247–56.

Weiss S. Tissue Destruction By Neutrophils. *N Engl J Med*. 1989; 320:365-76.

Wolkers PCB, Mantese OC, Paula A, Almeida VVP, Aguiar PADF, Alvares JR *et al*. Novos pontos de corte de sensibilidade nas taxas de resistência antimicrobiana de cepas invasivas de pneumococo. *J. Pediatr. (Rio J.)*. 2009;85(5):421-25.

WHO - *World Health Organization*. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec*. 2007; 82(12):93-104.

WHO - *World Health Organization*. Acute Respiratory Infections – Initiative for Vaccine Research. 2009.

Wu K, Zhang X, Shi J, Li N, Li D, Luo M, Cao J, Yin N, Wang H, Xu W, He Y, Yin Y. Immunization with a Combination of Three Pneumococcal Proteins Confers Additive and Broad Protection against *Streptococcus pneumoniae* Infections in Mice. *Infect Immun*. 2010; 78(3): 1276-83.