Cátia Taniela Perciani

Polissacarídeo Sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae* (PS6B) e Proteína de Superfície Pneumocócica A (PspA): Métodos de Conjugação e Avaliação da Resposta Imune

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

São Paulo
2011

Cátia Taniela Perciani

Polissacarídeo Sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae* (PS6B) e Proteína de Superfície Pneumocócica A (PspA): Métodos de Conjugação e Avaliação da Resposta Imune

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

Orientadora: Dra. Martha Massako Tanizaki

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Perciani, Cátia Taniela.

Polissacarídeo sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae* (PS6B) e proteína de superfície pneumocócica A (PspA): métodos de conjugação e avaliação da resposta imune / Cátia Taniela Perciani. - São Paulo, 2011.

Orientador: Martha Massako Tanizaki.

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 conjugadas.

Versão do título para o inglês: Polysaccharide serotype 6B of *Streptococcus pneumoniae* (PS6B) and pneumococcal surface protein A (PspA): conjugation methods and immune response evaluation.

Descritores: 1. *Streptococcus pneumoniae* 2. PspA 3. Conjugação 4. DMT-MM I. Tanizaki, Martha Massako II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB064/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cátia Taniela Perciani.

Título da Dissertação: Polissacarídeo sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae* (PS6B) e proteína de superfície pneumocócica A (PspA): métodos de conjugação e avaliação da resposta imune.

Orientador(a): Martha Massako Tanizaki.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Vacina conjugada antipneumocócica PS6B-PspA", protocolo nº 518/08, sob a responsabilidade de Matha Massako Tanizaki e Cátia Taniela Perciani, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 18/09/2008.

We certify that the research entitled "Antipneumococcal conjugate vaccine PS6B-PspA", protocol nº 518/08, under the responsibility of Matha Massako Tanizaki and Cátia Taniela Perciani, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 09/18/2008.

Vigência do Projeto: 09/2008 – 02/2011	Nº de animais/espécie
	140 fêmeas / camundongo – Balb/c

São Paulo, 23 de setembro de 2008.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Em memória de minha eterna amiga Karina
Bisaio: pela amizade, pela alegria e pelos
ensinamentos. Uma alma iluminada que, sem
querer, despertou-me para a vida e para o
desejo de cumprir com louvor o meu papel.
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à minha família: meu pai, José, que sempre me incentivou a superar meus limites e buscar novos desafios; minha mãe, Teresinha, que com tamanha doçura foi capaz de me ouvir com paciência e amor; minha querida irmã, Tânia, que, com admirável generosidade, sempre me dedicou cuidados e atenção e meu grande amigo Celso com o qual pude contar sempre.

Ao meu mais que amigo, meu companheiro, Fernando Paolo, que tantas vezes me ouviu, incentivou e inspirou.

À minha orientadora, Martha Tanizaki, que com seu conhecimento, sinceridade, espontaneidade e alegria propiciou um ambiente de trabalho incomparavelmente agradável e a qual sempre se mostrou disposta a ajudar.

A todos os amigos conquistados nesses anos de Butantan, pessoas incríveis com as quais pude dar boas risadas e também dividir momentos de dificuldades tornando-os muito mais leves: Giovana, Cibelly, Dúnia, Verônica, Talita, Míriam, Michelle, Rogéria, Raquel, Maysa, Fátima, Marisa, Salete, Luciana entre tantos outros com os quais tive a honra de conviver durante esses anos.

Aos amigos: Mariana, Renato, Suelen, Lilian que participaram dessa fase de minha vida com paciência e carinho. Obrigada!

Ao Enéas pela disposição em ajudar com os ensaios de Dicroísmo Circular.

Agradeço de forma especial a Deus, por ter colocado todas essas pessoas incríveis em minha vida, por ter me alimentado com coragem e determinação e por sempre se fazer presente.

Agradeço à FAPESP, por ter financiado esse projeto e termino agradecendo a todos os camundongos que literalmente deram seu sangue e suas vidas por esse trabalho.

Obrigada!

RESUMO

PERCIANI, C. T. **Polissacarídeo Sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae* (PS6B) e Proteína de Superfície Pneumocócica A (PspA):** Métodos de Conjugação e Avaliação da Resposta Imune. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Streptococcus pneumoniae é a maior causa de doenças infecciosas invasivas. As vacinas conjugadas, ao contrário das vacinas polissacarídicas, se mostram eficazes na indução de uma resposta protetora em crianças menores de 2 anos de idade. Entretanto, apesar do sucesso na redução dos casos de doenças pneumocócicas, publicações recentes têm mostrado um aumento nos casos de doença por sorotipos de *S. pneumoniae* não incluídos nas vacinas conjugadas atualmente licenciadas. Com o objetivo de evitar a substituição dos sorotipos prevalentes e aumentar a cobertura vacinal, nosso projeto prevê a introdução de uma proteína de superfície do pneumococo como carreador em uma vacina conjugada. A Proteína de Superfície Pneumocócica A (PspA), por ser conservada entre diversos sorotipos e por sua alta imunogenicidade, foi escolhida para constituir o conjugado, juntamente com o Polissacarídeo Capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 6B (PS6B), um sorotipo de elevada prevalência no Brasil. Também foi avaliada a influência de diferentes espaçadores entre a proteína carreadora e o PS sobre a resposta imune induzida. Estudos envolvendo diferentes condições reacionais tiveram como objetivo o estabelecimento de um protocolo de conjugação com elevado rendimento. A substituição do ativador EDAC (hidrocloreto de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida), comumente empregado na ativação do grupo carboxila da proteína, pelo DMT-MM (cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino) foi capaz de aumentar significativamente o rendimento reacional, o qual passou de menos de 10% para aproximadamente 50%. A proteção com formaldeído dos grupos lisinas da PspA aumentou a especificidade da reação de conjugação, com consequente aumento no rendimento reacional. A PspA modificada manteve a mesma estrutura secundária apresentada pela PspA nativa (análise por dicroísmo circular - CD) bem como sua imunogenicidade (título de anticorpos, capacidade de deposição de complemento e atividade opsonofagocítica). Apesar das análises por CD mostrarem que a conjugação alterou a estrutura secundária da PspA, ensaios imunológicos mostraram que essa desestruturação não afetou a sua capacidade de induzir uma resposta imune protetora. A resposta anti-PspA e anti-PS6B induzida pelo conjugado mostrou-se dose dependente, muito embora o PS6B tenha se comportado como um antígeno pouco imunogênico.

Palavras-Chave: *Streptococcus pneumoniae*. PspA. Conjugação. DMT-MM.

ABSTRACT

PERCIANI, C. T. **Polysaccharide Serotype 6B of *Streptococcus pneumoniae* (PS6B) and Pneumococcal Surface Protein A (PspA): Conjugation Methods and Immune Response Evaluation.** 2011. 126 p. Master Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Streptococcus pneumoniae is the main cause of invasive infectious diseases. Unlike polysaccharide (PS) based vaccines, conjugate vaccines have shown to protect children less than 2 years old. However, regardless of the success in reducing pneumococcal disease, recent reports have shown an increase in the rate of disease caused by serotypes not included in licensed conjugate vaccines. In order to avoid serotype replacement, our project proposes to test a surface exposed pneumococcal protein as carrier. Pneumococcal Surface Protein A (PspA), a conserved protein among various serotypes, and highly immunogenic was chosen to take part in the conjugate together with the Polysaccharide Serotype B of *Streptococcus pneumoniae* (PS6B), a serotype of high incidence in Brazil. In this sense, studies involving different reactional conditions were aimed at establishing a high yield conjugation protocol. Also, the influence of different spacer between carrier protein and polysaccharide were evaluated on immune response. The replacement of EDAC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride), usually used in the activation of protein carboxyl groups, to DMT-MM (4-[4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl]-4-methylmorpholinium chloride), was able to significantly increase the reactional yield from less than 10% to approximately 50%. The protection of lysines groups of PspA with formaldehyde increased conjugation specificity, with subsequent increase in reactional yield. Modified PspA maintained the same secondary structure of native PspA (circular dichroism analyses - CD) as well as its immunogenicity (antibody titers, deposition of complement and opsonophagocytic activity). Despite circular dichroism analyses have shown changes in PspA secondary structure, immunological tests proved that this alteration did not affect its ability in inducing a protective immune response. Anti-PspA and anti-PS6B responses proved to be dose dependent, although PS6B acted as a poor immunogenic antigen in mice.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. PspA. Conjugation. DMT-MM.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH – Diidrazida do ácido adípico

Al(OH)₃ – hidróxido de alumínio

ANOVA - Análise de Variância

APC – Célula Apresentadora de Antígenos

BCA – Ácido bicinchonínico

BSA – Albumina sérica bovina

C3 – Proteína C3 da cascata de complemento

CbpA – Proteína de ligação à colina

CCR7 - Receptor 7 da Quimiocina CC

CD – Dicroísmo Circular

CD – *Cluster of differentiation* (*Cluster* de diferenciação)

CDR – Região Definidora de Clado

Coad. – Co-administrado

ConA – Concanavalina A

Conj. – Conjugado

CR – Receptor do Complemento

CRM₁₉₇ – Proteína Diftérica detoxificada geneticamente

Da – Dalton

DMT-MM - Cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino

D.O. – densidade óptica

EDAC - Hidrocloreto de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida

EDTA – Ácido etilenodiamino – tetra – acético

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay* – Ensaio Imunoenzimático

FDA – *Food and Drugs Administration*

FITC – Isotiocianato de Fluorescência

G-25 - Sephadex G-25

Gal – Galactose

Glc – Glicose

HCl – Ácido clorídrico

HPLC – *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

IgG – Imunoglobulina de classe G

IgG1 – Imunoglobulina de classe G subclasse 1

IgG2a – Imunoglobulina de classe G subclasse 2a

IgG3 – Imunoglobulina de classe G subclasse 3

IgM – Imunoglobulina de classe M

ITAM – *Immunoreceptor tyrosin-based activation motif* (Imunoreceptores com Motivo Ativador baseado em Tirosina)

MES – Ácido Monomorfolinoetanosulfônico

MHC – Complexo de Histocompatibilidade

MHCII – Complexo de Histocompatibilidade de Classe II

NaBH₃CN – cianoboroidreto de sódio

NaBH₄ – boroidreto de sódio

OCT – 1,8 diaminooctano

OMS – Organização Mundial da Saúde

OPA – Ensaio de opsonofagocitose

OPD – Orto-fenildiamina

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salina)

PBS-T – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Salina) acrescido de 0,05 % de Tween 20

pI – Ponto isoelétrico

PS – Polissacarídeo Capsular

PS6B – Polissacarídeo Capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B

PS6B-ADH – Polissacarídeo Capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B ligado a diidrazida do ácido adípico

PS6B-OCT – Polissacarídeo Capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B ligado a 1,8 diaminooctano

PS6B-oxi – Polissacarídeo Capsular de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B oxidado

PsaA – *Pneumococcal Surface Adhesin A* (Adesina de Superfície Pneumocócica A)

PspA – *Pneumococcal Surface Protein A* (Proteína de Superfície Pneumocócica A)

PspA1 – Proteína de Superfície Pneumocócica A de clado 1

PspA1_{mod} – Proteína de Superfície Pneumocócica A de clado 1 modificada por reação com formaldeído.

PspA3 – Proteína de Superfície Pneumocócica A de clado 3

PspA3_{mod} – Proteína de Superfície Pneumocócica A de clado 3 modificada por reação com formaldeído.

PspC - *Pneumococcal Surface Protein C* (Proteína de Superfície Pneumocócica C)

Rha – Ramnose

S-400 - SephacrylTM S-400

SAD – Diidrazida do ácido sebácico

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
(Sulfatododecil de sódio – eletroforese de gel poliacrilamida)

T.T. – Toxóide Tetânico

TFA – Ácido Trifluoracético

Th- Célula T auxiliar também conhecida como T CD4⁺.

THY – Meio Todd-Hewitt acrescido de 0,05 % de extrato de levedura

TNBS - Ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfônico

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV - Ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Resposta imune do tipo T-independente. O BCR, presente na superfície de células B, liga-se à subunidade monomérica do polissacarídeo gerando sinais intracelulares que levam à ativação dos linfócitos B. A interação de produtos de degradação da proteína C3b do complemento com o receptor CR2 (também conhecido como CD21) permite a aproximação das proteínas de membrana CD19 e CD81 que amplificam os sinais intracelulares para expansão clonal de células B e induzem a secreção de anticorpos..... **27**

Figura 2: Conjugados e a Indução de Resposta Imune do Tipo T-dependente. A porção polissacarídica do conjugado liga-se ao BCR presente nos linfócitos B permitindo sua ativação. Tanto no próprio linfócito B quanto em células apresentadoras de antígenos (APCs) a porção protéica do conjugado é internalizada e processada para subsequente apresentação via MHC classe II. No linfonodo os antígenos protéicos apresentados pelas APCs ligados ao MHCII interagem com o TCR presentes em células T CD4⁺ inativas promovendo sua ativação. Células B expondo epítomos via MHC II e células T ativadas têm a expressão do receptor de CCR7 aumentadas e reduzidas respectivamente, e, como esse receptor responde às quimiocinas produzidas na zona T, essa alteração na expressão de CCR7 permite que haja a migração dessas células para a margem do folículo permitindo o encontro de ambas. A interação das moléculas co-estimulatórias, CD40-CD40L e CD28-B7, permite a geração dos sinais necessários para a expansão de células B, bem como para a troca de isotipos, a indução de memória imunológica e a maturação da afinidade..... **30**

Figura 3: Esquema propondo a relação entre a PspA e outras moléculas de superfície do *S. pneumoniae*. A PspA liga-se à parede celular através de seu domínio colina. Sua porção carregada positivamente interage com a porção negativa do PS capsular e determina sua forma estendida e consequente exposição na superfície do pneumococo. **36**

Figura 4: Unidade monomérica do polissacarídeo capsular sorotipo 6B. **37**

Figura 5: Unidade monomérica do polissacarídeo capsular sorotipo 6A. **37**

Figura 6: Etapas para obtenção dos diferentes conjugados..... **41**

Figura 7: Análise da resposta imune. * Quantificação de anticorpos IgG anti-PS6B e anti-PspA. ** Análise da deposição de complemento e atividade opsonofagocítica para cepas PspA clado 1 ou clado 3..... **42**

Figura 8: Unidade Monomérica do polissacarídeo capsular sorotipo 6B (PS6B). Setas em azul apontam os locais susceptíveis à hidrólise ácida.	56
Figura 9: Perfil Cromatográfico do PS6B em diferentes condições hidrolíticas - Coluna Sephacryl S-400 em sistema Akta Prime. Fase móvel: NaCl 0,2 M (1 mL/min).	57
Figura 10: Perfil Cromatográfico do PS6B após hidrólise com TFA - Coluna Sephacryl S-400 em sistema Akta Prime. Fase móvel: NaCl 0,2 M (1 mL/min).	59
Figura 11: Cromatograma do PS6B nativo e hidrolisado. Coluna Sephacryl S-400 em sistema Akta Prime. Fase móvel: NaCl 0,2 M (1 mL/min).	59
Figura 12: Esquema representativo da oxidação de hidroxilas vicinais com consequente formação de grupos aldeídos.	60
Figura 13: Locais passíveis de oxidação por NaIO ₄ na molécula de PS6B e os produtos gerados.	61
Figura 14: Procedimento de análise para determinação dos sítios de oxidação.	61
Figura 15: Reações de derivatização do PS-oxidado com diferentes espaçadores: ADH, SAD e OCT com a posterior adição de NaBH ₄	63
Figura 16: Representação de uma molécula de diidrazida do ácido adípico ligada ao terminal que sofreu oxidação.	64
Figura 17: Perfil Eletroforético de diferentes amostras de PspA (clado 1 e clado 3) cedidas pelo Laboratório de Fermentações do Instituto Butantan. Gel de Poliacrilamida 12%. Padrão de alto peso molecular (PM). PspA1: 1-4; PspA3: 5-9.	64
Figura 18: PspA3. Análise por Eletroforese Bi-dimensional. <i>Drystrip</i> de 7 cm e pH 4-7. Gel de poliacrilamida 10%. Padrão de alto peso molecular (PM).	65
Figura 19: Análise por Eletroforese Bi-dimensional. A) PspA3; B) PspA1. <i>Drystrip</i> de 7 cm e pH 4-7. Gel de poliacrilamida 10%. Padrão de alto peso molecular (PM).	66
Figura 20: Conjugação pelo método de Aminoação Redutiva. O nitrogênio presente no grupo amina da proteína (A) ataca o carbono deficiente em elétrons do grupo aldeído do PS (B) formando uma base de Schiff, a qual, subsequentemente, é reduzida pela adição de cianoboroidreto de sódio formando o conjugado PS-Proteína (C).	67

Figura 21: Cromatograma do PS6B-oxidado antes da conjugação (PS-oxid), PS6B após reação de conjugação (PS6B-Conj), PspA1 nativa (PspA1), PspA1 após reação de conjugação (PspA1-Conj). Coluna Sephacryl S-400 em sistema Akta Prime. Fase móvel: NaCl 0,2 M (1 mL/min). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. . 68

Figura 22: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-oxidado e a PspA1 pelo método de aminação redutiva. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circulada por linhas pontilhadas. 69

Figura 23: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-oxidado e a PspA3 pelo método de aminação redutiva. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circulada por linhas pontilhadas. 70

Figura 24: Ativação da proteína pelo EDAC. O grupamento carboxilato da proteína (A) sofre ataque nucleofílico pelo nitrogênio presente no EDAC (B) gerando um intermediário reativo (A-B) que reage com o PS derivatizado com diamina ou hidrazida (C), gerando o conjugado (A-C) e liberando o subproduto oxidado do EDAC – EDU (D). 71

Figura 25: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-ADH e a PspA1 empregando-se o EDAC como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circulada por linhas pontilhadas. 72

Figura 26: Ativação da proteína pelo DMT-MM. O grupo carboxilato da proteína (A) ataca o carbono eletrofílico do anel triazínico do DMT-MM (B) gerando um intermediário reativo (A-B) que reage com o PS derivatizado com diamina ou hidrazida (C), gerando o conjugado (A-C). 73

Figura 27: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-ADH e a PspA1 empregando o DMT-MM como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circulada por linhas pontilhadas. 75

Figura 28: Deposição de complemento sobre cepas de *S. pneumoniae* expressando PspA3. Cepas: A= P30; B= P36; P122; C= 122; D=539; E=1148; F=P5. Linha sólida: Soro de animais imunizados com PspA3 nativa; Linha Tracejada: Soro de animais imunizados com PspA3 modificada..... **76**

Figura 29: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-ADH e a PspA3mod empregando o DMT-MM como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circulada por linhas pontilhadas. **77**

Figura 30: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-OCT e a PspA1mod empregando o DMT-MM como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circulada por linhas pontilhadas. **78**

Figura 31: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-OCT e a PspA3mod empregando o DMT-MM como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circulada por linhas pontilhadas. **79**

Figura 32: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-ADH e o T.T empregando o DMT-MM como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. As frações conjugadas estão circuladas por linhas pontilhadas. **80**

Figura 33: Perfil eletroforético dos conjugados. Gel de Poliacrilamida 10%. 1- Padrão de alto P.M. para proteína; 2- PspA3; 3 – PS6B; 4 – Conj. PS6B ADH – PspA3; 5 – Conj. PS6B oxid PspA3; 6 - Conj. PS6B OCT –PspA3; A) *Comassie Blue*; B) Coloração de Shiff..... **81**

Figura 34: Exposição de epítomos nos conjugados. Em azul incubação com anticorpos IgG anti-PS6B e em roxo anti-PspA3..... **82**

Figura 35: Título de anticorpos IgG anti-PS6B. Dose empregada nas imunizações: 5 µg de PS6B livre ou conjugado **(A)** à PspA3 ou **(B)** à PspA1. Vacina comercial Prevenar® foi utilizada como controle dos ensaios (1/5 da dose humana/dose). Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas p<0.05 (ANOVA: fator único, teste de Tukey). **84**

Figura 36: Concentração de anticorpos IgG anti-PS6B. Dose empregada nas imunizações: 40 µg de PS6B coadministrado, 4 µg de PS6B conjugado (1X) ou 40 µg de PS6B conjugado (10X). Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey)..... **85**

Figura 37: Título de anticorpos IgG anti-PS6B. **A)** Conjugados PS6B-PspA3; **B)** Conjugados PS6B-PspA1. Dose empregada nas imunizações: A) 30 µg de PS6B livre ou conjugado à PspA3 ou ao T.T. B) 15 µg de PS6B livre ou conjugado à PspA1. Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey)..... **86**

Figura 38: Detecção de IgG sérico anti-PS6B e anti-PS14 no soro de camundongos imunizados com a Prevenar® (1/5 da dose humana/dose)..... **88**

Figura 39: Título de anticorpos IgG anti-PspA1. Dose empregada nas imunizações: 5 µg de PspA1 livre ou conjugada. Vacina comercial Prevenar® (0 µg de PspA3). Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey)..... **91**

Figura 40: **A)** Título de anticorpos IgG anti-PspA3. **B)** Relação entre IgG1 e IgG2a anti-PspA3. **C)** Ensaio de deposição de complemento - Cepa 275/97 (PspA clado 3, sorotipo 14). **D)** Índice de Fluorescência (FI) para o ensaio de deposição de complemento. Dose empregada nas imunizações: 5 µg de PspA3 livre ou conjugada. Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey)..... **93**

Figura 41: **A)** Título de anticorpos IgG anti-PspA3. **B)** Relação entre IgG1 e IgG2a anti-PspA3. **C)** Ensaio de deposição de complemento - Cepa 275/97 (PspA clado 3, sorotipo 14). **D)** Intensidade de Fluorescência (FI) para o ensaio de deposição de complemento. Dose empregada nas imunizações: 60 µg de PspA3 livre, 6 µg ou 60 µg de PspA3 conjugada (1X e 10X respectivamente). Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey)..... **95**

Figura 42: **A)** Título de anticorpos IgG anti-PspA3. **B)** Relação entre IgG1 e IgG2a anti-PspA3. **C)** Ensaio de deposição de complemento - Cepa 275/97 (PspA clado 3, sorotipo 14). **D)** Índice de Fluorescência (FI) para o ensaio de deposição de complemento. Dose empregada nas imunizações: 56 µg de PspA3 nativa coadministrada com PS6B, 20 µg de PspA3mod coadministrada com PS6B, 56 µg de PspA3 conjugado ao PS6B oxid, 20 µg de PspA3 conjugada ao PS6B ADH, 18 µg de PspA3 conjugado ao PS6B OCT. Soro obtido na 3ª Sangria. *diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey)..... **97**

Figura 43: Ensaio de Opsonofagocitose. Soros em teste, diluídos 1:16, foram incubados com a cepa P122 (PspA clado 3, sorotipo 10 A), seguido de 10% de fonte de complemento e

células isoladas do peritônio. As bactérias foram plaqueadas em ágar sangue e o número de UFCs viáveis foi determinado após 20h. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: Fator Único, teste de Tukey)..... 99

Figura 44: A) Título de anticorpos IgG anti-PspA1. **B)** Relação entre IgG1 e IgG2a anti-PspA1. **C)** Ensaio de deposição de complemento - Cepa 245/00 (PspA clado 1, sorotipo 14) e Cepa P630 (PspA clado 1, sorotipo 14). Dose empregada nas imunizações: 45 µg de PspA3 nativa coadministrada com PS6B, 21 µg de PspA3mod coadministrada com PS6B, 48 µg de PspA3 conjugado ao PS6B oxid, 11 µg de PspA3 conjugada ao PS6B ADH, 30 µg de PspA3 conjugado ao PS6B OCT. Soro obtido na 3ª Sangria. *diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey). 100

Figura 45: A) Índice de Fluorescência (FI) para o ensaio de deposição de complemento. **B)** Ensaio de Opsonofagocitose. Soros em teste, diluídos 1:16, foram incubados com a cepa 245/00 (PspA clado 1, sorotipo 10 A), seguido de 10% de fonte de complemento e células isoladas do peritônio. As bactérias foram plaqueadas em ágar sangue e o número de UFCs viáveis determinado após 20h. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: Fator Único, teste de Tukey). 101

Figura 46: Análise da Estrutura Secundária da PspA3 por Dicroísmo Circular. 102

Figura 47: Deconvolução dos dados obtidos por CD para a PspA3 livre (nativa ou modificada) ou para a PspA3 conjugada. Porcentagem de cada estrutura é apresentada sobre sua respectiva barra..... 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema de Imunização para teste dos diferentes conjugados.....	47
Tabela 2 - Condições utilizadas no ensaio de hidrólise do PS6B e seus respectivos resultados.....	57
Tabela 3 - Condições utilizadas no ensaio de hidrólise do PS6B com TFA.....	58
Tabela 4 - Condições reacionais adotadas e respectivos rendimentos para a síntese de conjugados intermediada pelo agente ativador DMT-MM.....	74
Tabela 5 - Composição dos conjugados empregados em imunizações	83
Tabela 6 - Comparação dos conjugados quanto às vantagens como antígeno vacinal	104

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	23
1.2 Cenário Clínico e Epidemiológico.....	24
1.3 Vacinas.....	25
1.4 Vacina Conjugada PspA-PS6B – Nossa Proposta.....	34
1.4.1 <i>Proteína de Superfície Pneumocócica A - PspA</i>	35
1.4.2 <i>Polissacarídeo Capsular Sorotipo 6B (PS6B)</i>	37
1.4.3 <i>Conjugação entre PS e Proteína</i>	38
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 Preparação do PS6B para Conjugação	43
3.1.1 <i>Hidrólise do PS6B</i>	43
3.1.2 <i>Oxidação do PS6B</i>	43
3.1.3 <i>Derivatização do PS6B com Diidrazida do Ácido Adípico (ADH)</i>	43
3.1.4 <i>Derivatização do PS6B com 1,8 Diaminooctano (OCT)</i>	44
3.2 Preparação da PspA para Conjugação.....	44
3.2.1 <i>Obtenção da PspA1 e PspA3</i>	44
3.2.2 <i>Proteção dos resíduos de lisina presentes na PspA</i>	44
3.3 Conjugação	45
3.3.1 <i>Conjugação pelo Método de Aminoação Redutiva</i>	45
3.3.2 <i>Conjugação utilizando EDAC como ativador</i>	45
3.3.3 <i>Conjugação utilizando DMT-MM como ativador</i>	45
3.4 Ensaios Imunológicos.....	46
3.4.1 <i>Cepas de Streptococcus pneumoniae</i>	46
3.4.2 <i>Esquema de Imunização</i>	46
3.4.3 <i>Quantificação de Anticorpos Anti-PspA</i>	46
3.4.4 <i>Quantificação de Anticorpos Anti-PS6B</i>	48
3.4.5 <i>Quantificação dos Isotipos IgG1 e IgG2a anti-PspA</i>	48

3.4.6 Ensaio de Deposição de Complemento.....	49
3.4.7 Ensaio de Opsonofagocitose.....	49
3.4.8 Ensaio de Exposição de Epítomos.....	50
3.5 Métodos Analíticos	51
3.5.1 Quantificação de PS6B pelo método de Fenol-Sulfúrico	51
3.5.2 Quantificação de aldeído	51
3.5.3 Quantificação de proteína.....	52
3.5.4 Quantificação de Aminas e Hidrazidas – Método TNBS.....	52
3.5.5 Cromatografia por Gel-Filtração (ou exclusão molecular)	52
3.5.6 Cromatografia Hidrofóbica	53
3.5.7 HPLC	53
3.5.8 Determinação dos pontos de oxidação do PS6B.....	53
3.5.9 Eletroforese SDS-PAGE	54
3.5.10 Eletroforese Bi-dimensional	54
3.5.11 Análise por Dicroísmo Circular	54
3.5.12 Análise Estatística	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 Preparação do PS6B para Conjugação	56
4.1.1 Hidrólise do PS6B.....	56
4.1.2 Oxidação	60
4.1.3 Determinação dos pontos de oxidação do PS6B.....	61
4.1.4 Derivatização.....	62
4.2 Preparação da PspA para Conjugação.....	64
4.3 Conjugação	66
4.3.1 Conjugação pelo método de Aminoação Redutiva.....	66
4.3.2 Conjugação intermediada pelo EDAC	70
4.3.3 Conjugação intermediada pelo DMT-MM	72
4.4 Análise dos Conjugados.....	80
4.5 Avaliação da Resposta Imunológica.....	82
4.5.1 Avaliação de resposta imune induzida contra PS6B	83
4.5.2 Avaliação da Resposta Imune induzida contra a PspA.....	89

4.6 Determinação da Estrutura Secundária da PspA	102
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
6 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria encapsulada, gram-positiva com morfologia de cocos, diplococos lanceolados ou cadeias. A superfície do pneumococo consiste de 3 estruturas distintas: membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica. A membrana plasmática apresenta estrutura conservada e com moléculas de ácido lipoteicóico – contendo resíduos de fosfocolina (ChoP) – inseridas na bicamada lipídica. A parede celular é composta de polissacarídeos e ácido teicóico, e ancora diversas proteínas de superfície. O ácido teicóico, conhecido como polissacarídeo C, é o responsável pela intensa resposta inflamatória observada na infecção por pneumococo, com ativação do sistema complemento e produção de citocinas (KIM e WEISER, 1998).

Os polissacarídeos (PS) presentes no envoltório externo do pneumococo são polímeros de alto peso molecular, cuja unidade básica compreende entre 3 a 6 monômeros podendo conter também grupos fosfatos e glicerol. Esse envoltório mais externo da bactéria protege-a contra a fagocitose, sendo considerado seu principal fator de virulência (HAUSDORFF; SIBER; PARADISO, 2009; HYAMS et al., 2010; VARVIO et al., 2009).

As diferenças na composição química da cápsula polissacarídica e a habilidade do sistema imune em reconhecer essas diferenças estruturais permitem a distinção da *S. pneumoniae* em sorotipos. Há mais de 90 sorotipos descritos, sendo que 24 desses relacionam-se com a patogenicidade observada em humanos (BRATCHER et al., 2010; HAUSDORFF; SIBER; PARADISO, 2009; PARK et al., 2007a; PARK et al., 2007b).

Além da cápsula polissacarídica, diversas proteínas contribuem para a virulência do pneumococo tais como a Proteína de Superfície de Pneumocócica A (PspA), a Proteína de Superfície Pneumocócica C (PspC), a Pneumolisina (Ply), a Neuraminidase A (NamA) e o Adesina de Superfície Pneumocócica A (PsaA) (ALONSODEVELASCO et al., 1995; KADIOGLU et al., 2004; BAROCCHI; CENSINI;

RAPUOLLI, 2007). Dentre essas proteínas destaca-se a PspA, proteína essa com forte participação nas propriedades antifagocíticas da bactéria, sendo considerada um dos principais fatores de virulência (ALONSODEVELASCO et al., 1995; BRILES et al., 1996; HERMANSON, 1996; TU et al., 1999; BRILES et al., 2000a; HOLLINGSHEAD et al., 2000; BRILES et al., 2003; DANIELS et al., 2006; LI et al., 2007).

1.2 Cenário Clínico e Epidemiológico

Infecções por bactérias extracelulares encapsuladas são a maior causa de morbidade e mortalidade entre crianças, idosos, indivíduos imunossuprimidos e pacientes com doenças crônicas (SCOTT, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). *Streptococcus pneumoniae* encontra-se, juntamente com *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*, como as principais bactérias encapsuladas patogênicas que representam um problema de Saúde Pública no Brasil (BRANDILEONE et al., 1995; BRANDILEONE et al., 2003; LAVAL et al., 2006).

Além do quadro de pneumonia, otite média aguda e sinusite, o pneumococo, ao sofrer disseminação para outros focos como sistema nervoso central, espaço pleural, ossos e articulações, pode causar bacteremia, meningite, peritonite, osteomielite, e sepse (WHO, 2009).

S. pneumoniae faz parte da flora comensal, colonizando assintomaticamente a nasofaringe de 60% das crianças saudáveis e 30% dos adultos saudáveis (BRIDY-PAPPAS et al., 2005). Sob condições normais o pneumococo mantém uma relação comensal com o hospedeiro. As manifestações clínicas ocorrem quando há disseminação para os seios da face, ouvido médio, aspiração para o trato respiratório baixo ou invasão da corrente sanguínea. A habilidade de progredir para uma doença invasiva varia de acordo com o sorotipo e com a idade e saúde do indivíduo (BRUEGGEMANN et al., 2003).

Estima-se que anualmente 10.6 milhões de crianças menores de 5 anos são acometidas por doenças pneumocócicas (BLACK; MORRIS; BRYCE, 2003) e que cerca de 2 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade morrem por infecções respiratórias agudas no mundo (WILLIAMS et al., 2002; CHERIAN, 2007;

O'BRIEN et al., 2009; DUGGAN, 2010). De acordo com Klein et al. (1997) aproximadamente 60% das crianças apresentam ao menos um episódio de otite média aguda (OMA) antes do primeiro ano de idade.

A aderência do pneumococo ao epitélio traqueal é facilitada pela co-infecção com vírus influenza. Estudos de amostras clínicas positivas para o vírus H1N1 mostraram que 57% dos casos clínicos considerados graves possuíam co-infecções por *S. pneumoniae* (PALACIOS et al., 2009). Essa maior morbidade e mortalidade nos casos que apresentavam co-infecção por pneumococo deve-se ao fato de a neuroaminidase viral clivar ácido siálico de glicosíngolípídeos do pulmão e expor estruturas que atuam como receptor para aderência do pneumococo, aumentando os casos de pneumonia e septicemia em pacientes acometidos por infecções virais (ALONSODEVELASCO et al., 1995; BRUNDAGE, 2006).

Um estudo conduzido em países da América Latina (Brasil, Argentina, Uruguai, Chile, Colômbia e México) mostrou que os sorotipos mais frequentes na população são: 14, 6A/6B, 5, 1, 23F, 19F, 18C, 19A, 9V, 7F, 3, 4 e 9N, sendo que os oito primeiros correspondem por 86% do total de isolados, dos quais mais de 57% mostram-se resistentes a penicilina (SOLEY e ARGUEDAS, 2009).

Com o crescente aumento no número de cepas resistentes a antibióticos (LINARES et al., 2010) e ao fato de muitas vezes os antibióticos não serem capazes de evitar sequelas decorrentes da infecção, tais como surdez, deficiência neurológica e desordens motoras, a vacinação tem sido instituída pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a medida mais aconselhável (WHO, 2009).

1.3 Vacinas

Stenberg e Pasteur foram os primeiros a identificar a bactéria *S. pneumoniae* (AUSTRIAN, 1999) e Almroth E Wright, em 1911, o primeiro a sugerir que a inoculação do pneumococo morto poderia induzir proteção (WATSON e MUSHER, 1999). No final de 1920, os PS, tiveram sua antigenicidade reconhecida. Em 1944, MacLeod et al. avaliaram uma vacina pneumocócica composta por 4 PS em uma população de militares (MACLEOD et al., 1945). Os resultados desse ensaio conduziram ao licenciamento da vacina hexavalente para uso durante a Segunda

Guerra Mundial. Apesar de sua eficácia, essa vacina sofreu um retrocesso com o advento da “era dos antibióticos”, só tendo seu interesse renovado durante a metade da década de 70 após o surgimento de diversas cepas resistentes a antibióticos (BOGAERT et al., 2004; BAROCCHI; CENSINI; RAPUOLLI, 2007).

Em 1977 foi lançada a vacina 14-valente, baseada na mistura de diversos polissacarídeos capsulares, a qual, em 1983, foi substituída pela vacina 23-valente, constituída por um número maior de PSs (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F) e utilizada até os dias atuais sob os nomes de Pneumovax 23 (Merck Sharp & Dohme, Whitehouse Station, N.J., EUA) e Pneumo 23 (Sanofi Pasteur AS, Lyon, França) (BUTLER et al., 1993).

As vacinas polissacarídicas induzem uma resposta imune denominada T-independente, dado que o PS, por conter epítomos repetitivos, é capaz de ativar células B na ausência de células T auxiliares (VOS et al., 2000).

As células B contém em sua superfície anticorpos (predominantemente IgM ou IgD de baixa afinidade) os quais juntamente com Imunorreceptores com Motivo Ativador baseado em Tirosina (ITAMs) formam o chamado Complexo de receptor do antígeno de células B (BCR) (Fig. 1). As subunidades repetitivas do PS se ligam a esses anticorpos de superfície permitindo a agregação de imunoglobulinas, Ig α e Ig β , e por consequência, a aproximação de ITAMs e geração de sinais intracelulares via fosforilação de proteínas (THOMPSON et al., 1984; VOS et al., 2000; BAUMGARTH, 2000; ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Esse primeiro sinal via reconhecimento do PS pelo BCR é capaz de induzir a ativação e a proliferação de células B de forma independente de células T, mas para que haja a secreção de anticorpos um segundo sinal é necessário. Esse segundo sinal é dado pelo sistema complemento (MOND; LEES; SNAPPER, 1995; CARROLL, 1998). Os PSs podem ativar diretamente a via alternativa do complemento através da ligação do grupo tioéster do C3b à hidroxila do PS, iniciando a cascata do complemento. A ligação de alguns dos produtos de degradação do C3b (C3d, C3dg e o iC3b) ao receptor CR2¹ dos linfócitos B aproxima duas outras proteínas de

¹ CR2 (ou CD21) – Receptor de complemento do tipo 2. Presente em células dendríticas foliculares e células B que ligam fragmentos proteolíticos da proteína do complemento C3, incluindo C3d, C3dg e iC3b. As funções do CR2 são estimular as respostas imunes humorais, aumentando a ativação de células B pelos antígenos (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

membrana, CD19² e CD81. A aproximação dessas moléculas ativa várias vias de sinalização e indução de citocinas, com consequente expansão clonal dos linfócitos B e amplificação da resposta imune humoral (OLIVER; MARTIN; KEARNEY, 1999; BAUMGARTH, 2000; CARROLL, 2004; ABBAS e LICHTMAN, 2005). Essa resposta do tipo T-independente caracteriza-se pelo predomínio de anticorpos IgM, sem a formação de células de memória (THOMPSON et al., 1984; VOS et al., 2000; BAUMGARTH, 2000; ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Figura 1: Resposta imune do tipo T-independente. O BCR, presente na superfície de células B, liga-se à subunidade monomérica do polissacarídeo gerando sinais intracelulares que levam à ativação dos linfócitos B. A interação de produtos de degradação da proteína C3b do complemento com o receptor CR2 (também conhecido como CD21) permite a aproximação das proteínas de membrana CD19 e CD81 que amplificam os sinais intracelulares para expansão clonal de células B e induzem a secreção de anticorpos.

² CD19 – responsável pela ativação de linfócitos B; forma um complexo co-receptor com CR2 e CD81, transmitindo sinais que sinergizam com os sinais do complexo do receptor antigênico dos linfócitos B (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Apesar de apresentar cobertura de até 90% contra pneumonia em adultos jovens (POLAND, 1999; MANGTANI; CUTTS; HALL, 2003), as vacinas polissacarídicas não se mostraram efetivas em crianças menores de 2 anos (PEETERS et al., 1991; FIORE et al., 1999; VOS et al.; 2000; LEE; LEE; FRASCH, 2003; BOGAERT et al., 2004; ABBAS e LICHTMAN, 2005).

A ineficácia nessa população é atribuída ao fato da zona marginal do baço apresentar-se ainda imatura, sem a presença do receptor CR2, impedindo assim a amplificação e o amadurecimento da resposta imune (KUMARARATNE e MACLENNAN, 1981; TIMENS et al., 1989; GRIFFIOEN et al., 1991; DAMMERS et al.; 1999). Essa presença reduzida de receptores CR2 parece ser uma espécie de estratégia do organismo para evitar auto imunidade contra PS neuronais presentes nessa fase do desenvolvimento (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

As proteínas, ao contrário dos PSs, exibem uma resposta dependente de células T, ou seja, para que haja o amadurecimento, a expansão clonal e a produção de anticorpos por linfócitos B é necessário o envolvimento de células T auxiliares (Th) com apresentação antigênica através do Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II (MHC II) . A conjugação do PS com uma proteína tem como objetivo permitir a utilização dessa via de ativação de células B. Desta forma crianças, ainda incapazes de elaborar uma resposta contra o PS livre, se tornam capazes de amplificar a resposta humoral contra o PS através de uma apresentação no contexto T-dependente.

Ao ser apresentado ao sistema imune, o conjugado exige uma ativação bidirecional, com envolvimento de linfócitos B e T (Fig. 2). As células B ao entrarem em contato com o conjugado reconhecem os epítomos repetitivos do PS e se tornam primadas para esse antígeno. Essas mesmas células também realizam o processamento endossomal da porção protéica e os peptídeos do conjugado são apresentados num contexto de MHC de classe II. Essas células B, agora ativadas, também passam a expressar em sua superfície moléculas co-estimulatórias como CD40L e B7 (Fig. 2).

Paralelamente à ativação dos linfócitos B, ocorre a ativação dos linfócitos T. Células apresentadoras de antígenos (APCs) expressando peptídeos protéicos do conjugado ligado ao MHC de classe II recrutam células Th *naïve* na zona de células

T dos linfonodos induzindo sua ativação, diferenciação e expansão clonal (McHEYZER-WILLIAMS et al., 2003). As células T uma vez ativadas também passam a expressar em sua superfície moléculas co-estimulatórias como o CD40 e o CD28 (Fig. 2).

A ativação das células B e T modificam a expressão do receptor de quimiocina CCR7, receptor esse que responde às quimiocinas produzidas na zona T, permitindo a migração dessas para a margem do folículo (Fig. 2). O TCR da célula T ativada liga-se ao epítipo protéico apresentado pelo MHC II da célula B. A subsequente ligação das moléculas co-estimulatórias (B7-CD28 e CD40L-CD40) geram o estímulo necessário para a expansão clonal das células B (responsivas ao mesmo tempo para o PS e para a proteína), troca de isotipos, indução de memória imunológica e maturação da afinidade (CRESSWELL, 1994; FOY et al., 1994; GERMAIN, 1994; GUTTORMSEN et al., 1999; BENSCHOP, 1999; HWANG et al., 2000; McHEYZER-WILLIAMS et al., 2003; ABBAS e LICHTMAN, 2005). É importante destacar que os compostos co-administrados não conseguiriam induzir o mesmo tipo de resposta, já que é necessário que a mesma célula B tenha contato com os dois compostos, PS e proteína.

Figura 2: Conjugados e a Indução de Resposta Imune do Tipo T-dependente. A porção polissacarídica do conjugado liga-se ao BCR presente nos linfócitos B permitindo sua ativação. Tanto no próprio linfócito B quanto em células apresentadoras de antígenos (APCs) a porção protéica do conjugado é internalizada e processada para subsequente apresentação via MHC classe II. No linfonodo os antígenos protéicos apresentados pelas APCs ligados ao MHCII interagem com o TCR presentes em células T $CD4^+$ inativas promovendo sua ativação. Células B expondo epítomos via MHC II e células T ativadas têm a expressão do receptor de CCR7 aumentadas e reduzidas respectivamente, e, como esse receptor responde às quimiocinas produzidas na zona T, essa alteração na expressão de CCR7 permite que haja a migração dessas células para a margem do folículo permitindo o encontro de ambas. A interação das moléculas co-estimulatórias, CD40-CD40L e CD28-B7, permite a geração dos sinais necessários para a expansão de células B, bem como para a troca de isotipos, a indução de memória imunológica e a maturação da afinidade.

O processo de conjugação entre uma proteína e um PS foi primeiramente demonstrado em 1920s por Goebel e Avery (TILLET; AVERY; GOEBEL, 1929), mas só em 1980s foi licenciada a primeira vacina conjugada, contra *Haemophilus*

influenzae tipo b. Essa vacina foi responsável por debelar as epidemias de meningite provocadas por hemófilus nos Estados Unidos e em muitos países da Europa. Devido ao sucesso da vacina anti-hemófilus, o processo de conjugação foi adotado para a produção de vacinas antimeningocócicas e antipneumocócicas.

A Prevenar® (Wyeth Lederle Vaccines, Louvain-la-Neuve, Bélgica), vacina conjugada antipneumocócica 7-valente (PCV7), constituída pelos polissacarídeos capsulares 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados à proteína CRM197 foi licenciada nos EUA em 2000. O período que sucedeu sua inserção no calendário de vacinação mostrou significativa redução na incidência de infecções causadas por *S. pneumoniae* em países como EUA, Canadá, França e Reino Unido. De 2000 a 2004 observou-se uma redução de 96,6% dos casos de infecções pneumocócicas invasivas entre crianças nos EUA (HICKS et al., 2007). No Canadá, dados revelam que essa redução chegou a 95,1% no período de 2001 a 2004 (KELLNER et al., 2005). Na França foi documentada a redução de 82% nos casos de meningite pneumocócica entre crianças menores de 2 anos entre 2001 e 2005 (DUBOS et al., 2007). No Reino Unido a redução de doença pneumocócica no período de 2006 a 2008 entre crianças da faixa etária destacada foi de 82,1% (HEALTH PROTECTION AGENCY, 2008). Embora os programas de imunização desses países sejam destinados a crianças menores de 2 anos, segundo Hicks et al (2007), estes programas acabaram repercutindo de forma significativa também na população não imunizada. Nos EUA, por exemplo, no período relatado acima, houve redução concomitante de 76,2% na incidência de infecções pneumocócicas invasivas na população acima de 65 anos (HICKS et al., 2007), havendo inclusive redução nas taxas de hospitalização entre a população não imunizada.

Se por um lado as vacinas conjugadas são muito mais eficazes do que o PS livre, inclusive para crianças menores de 2 anos, também são mais complexas e com um custo de produção mais elevado. O desenvolvimento de vacinas conjugadas requer inúmeras etapas, sendo a conjugação um dos passos mais complexos e de menor rendimento. Um problema adicional na produção de vacinas antipneumocócica conjugadas é a existência de múltiplos sorogrupos patogênicos. Assim, diferentemente de *H. influenzae* capsulado, onde os sorotipos tipo a e b são patogênicos, ou de *N. meningitidis* onde apenas alguns sorogrupos (A, B, C, Y,

W135) são associados a patologias (FRASCH, 1990), no caso de *S. pneumoniae*, são descritos pelo menos 24 sorotipos capazes de provocar infecção, entre os quais 12 sorotipos constituem cerca de 80% dos pneumococos isolados no Brasil (FRASCH, 1990; BRANDILEONE et al., 2003; SOLEY e ARGUEDAS, 2009).

Desta forma, somado à dificuldade de síntese dos conjugados está a obtenção dos diversos PSs. Os dados da literatura e os nossos dados mostram que não há uma condição de cultivo ótima que sirva para todos os sorogrupos do *S. pneumoniae*.

Essa complexidade do processo de produção incorporou a esse tipo de vacina conjugada um alto valor agregado, atraindo o interesse de diversas multinacionais. Após o lançamento da Prevenar® pela Wyeth, seguiram-se o lançamento de outras vacinas conjugadas antipneumocócicas, uma lançada pela Sanofi-Aventis, que utiliza uma mistura de toxóide tetânico e toxina diftérica como carreadores protéicos, e outra fabricada pela GlaxoSmithKline's, a PCV11-PD que utiliza a proteína D de *H. influenzae* como carreador (BAROCCHI; CENSINI; RAPUOLLI, 2007).

As vacinas conjugadas encontradas no mercado empregam um número limitado de carreadores protéicos tais como o toxóide tetânico, a toxina diftérica, ou sua forma mutante (CRM₁₉₇), o complexo protéico de membrana externa de *N. meningitidis* (OMV) ou ainda, mais recentemente, a proteína D de *H. influenzae*. Contudo, o uso do mesmo carreador em diferentes vacinas pode causar supressão da resposta imunológica. A presença de uma resposta T de memória, originária de uma imunização prévia contra um epítipo comum do carreador, pode inibir a indução de resposta pela vacina conjugada injetada posteriormente. Segundo Laferriere et al. (2005) e Dagan et al. (2010) quando o mesmo carreador protéico é usado por mais de um sorotipo em uma vacina multivalente, pode haver interferência na resposta desenvolvida contra esses sorotipos. Assim, a substituição desses carreadores, comumente empregados, por proteínas próprias do pneumococo mostra-se como uma alternativa promissora.

Essa proposta é reforçada pelo fato de muitas das proteínas do pneumococo constituir fatores de virulência importantes e ser bastante conservadas entre os diversos sorotipos de *S. pneumoniae*. Os fatos da reatividade cruzada entre os

diversos PS ser baixa e a redução no número de sorotipos comprometer a eficácia vacinal reforçam o emprego de proteínas do pneumococo como carreadoras.

Além disso, apesar do sucesso inicial no controle de infecções pneumocócicas após a introdução da Prevenar[®], dados recentes têm mostrado que em cerca de 5 anos os sorotipos contemplados pela vacina deixaram de ser prevalentes e foram substituídos por outros, ocasionando aumento nos casos de doenças pneumocócicas (DAGAN et al., 2002; PELTON; LOUGHLIN; MARCHANT, 2004; CHERIAN, 2007; O'BRIEN et al., 2007; MUNOZ-ALMAGRO et al., 2008; LEACH et al., 2009; CHIBUK et al., 2010; MEHTA, 2010; CHANG et al., 2010).

Mais recentemente, em 2010, foi aprovada pelo FDA (*Food and Drugs Administration*) a vacina Prevenar 13[®] (Wyeth), também chamada PCV13, que veio em substituição a Prevenar[®] 7 com a adição de mais 6 sorotipos conjugados (1, 3, 5, 6A, 7F e 19A). Estudos envolvendo a PCV13 mostraram ser ela efetiva do ponto de vista econômico e de saúde pública (RUBIN et al., 2010). Entretanto, assim como o observado para a PCV 7, após os primeiros anos de sucesso é esperado que haja a substituição dos sorotipos e redução na eficácia vacinal. Diante disso, mais do que o desenvolvimento de uma vacina capaz de induzir uma resposta T-dependente, é necessário o desenvolvimento de uma vacina com maior cobertura vacinal e que não dê espaço para a substituição de sorotipos.

O emprego de proteínas do pneumococo é uma estratégia promissora dado que possuem estruturas conservadas entre diversos sorotipos de *S. pneumoniae*. A escolha dessa proteína carreadora consiste em um passo fundamental para a segurança e eficácia vacinal.

Entre as proteínas relatadas como fatores de virulência expressos pelo *S. pneumoniae* estão a pneumolisina, a PsaA (Adesina de Superfície Pneumocócica A), a PspC (Proteína de Superfície Pneumocócica C) e a PspA (Proteína de Superfície Pneumocócica A) .

A pneumolisina é conhecida por sua atividade citolítica, capacidade de inibição da atividade bactericida, bem como inibição da proliferação de linfócitos e da síntese de anticorpos. Devido à indução de síntese de citocinas inflamatórias como IL1 β e TNF α , a pneumolisina é tida como responsável por parte dos sintomas de inflamação causados por doenças pneumocócicas (ALONSODEVELASCO et al.,

1995; KADIOGLU et al., 2004; BAROCCHI; CENSINI; RAPUOLLI, 2007; PRICE e CAMILLI, 2009). Apesar de ser uma proteína atuante na patogênese do pneumococo, até pouco tempo acreditava-se ser esta uma proteína intracelular liberada após lise do pneumococo o que a tornava um mal candidato a carreador protéico. Estudos recentes têm mostrado que a pneumolisina também pode ser encontrada na superfície do pneumococo, principalmente nos estágios mais tardios de crescimento (PRICE e CAMILLI, 2009), sendo sua imunogenicidade ainda motivo de estudo.

A PspC é composta por proteínas polimórficas (CbpA, SpsA, Hic) e pode ser classificada em 11 grupos. Devido ao seu polimorfismo e a falta de uma resposta cruzada entre diferentes cepas, a PspC não se mostra como um bom candidato vacinal (BAROCCHI, CENSINI e RAPUOLLI, 2007).

A PsaA é uma proteína altamente conservada que desempenha função de aderência na mucosa do hospedeiro, atuando nos estágios iniciais da infecção. Entretanto, por ser uma proteína pouco exposta na superfície do pneumococo tem se mostrado modestamente protetora contra infecções sistêmicas (LIN et al., 2009).

A PspA, por sua vez, possui capacidade de reduzir a deposição de complemento na superfície bacteriana, dificultando a opsonização e consequentemente a fagocitose do pneumococo (BRILES et al., 1996; HERMANSON, 1996). Estudos mostram que pelo menos uma parte da PspA está exposta na superfície das bactérias encapsuladas o que permite que anticorpos anti-PspA se liguem à superfície bacteriana permitindo a deposição de complemento (DANIELS et al., 2006). Além disso, anticorpos anti-PspA mostraram-se capazes de induzir proteção em animais em ensaios de imunização passiva (GOR et al., 2005). Com base nesses resultados acreditamos que a PspA seja a melhor escolha como carreador protéico e antígeno vacinal.

1.4 Vacina Conjugada PspA-PS6B – Nossa Proposta

Com o objetivo de evitar a substituição dos sorotipos prevalentes e aumentar a cobertura vacinal nosso projeto prevê a introdução de uma proteína própria do pneumococo como carreador em uma vacina conjugada. A Proteína de Superfície

Pneumocócica A (PspA), por ser conservada entre diversos sorotipos e por sua alta imunogenicidade, foi escolhida para constituir o conjugado, juntamente com o Polissacarídeo Capsular de *S. pneumoniae* sorotipo 6B (PS6B), um sorotipo de elevada prevalência no Brasil.

1.4.1 Proteína de Superfície Pneumocócica A - PspA

A PspA é um promissor antígeno vacinal devido à sua capacidade de inibir a deposição de complemento e a morte via apolactoferrina (TALKINGTON et al., 1991; HAMMERSCHMIDT et al., 1999; TU et al., 1999; BRILES et al., 2000a; BRILES et al., 2003; DANIELS et al., 2006; HOLLINGSHEAD et al., 2006; LI et al., 2007; OCHS et al., 2008). Expressa em todas as bactérias *S. pneumoniae* a PspA é constituída por 5 domínios: 1) um peptídeo sinal; 2) um domínio alfa-hélice; 3) um domínio rico em prolina; 4) um domínio ligado a colina; 5) uma curta cauda C-terminal (HOLLINGSHEAD et al., 2000).

O domínio de colina está contido na porção C-terminal e é responsável por unir a PspA com a fosfocolina (PC) do ácido lipoteicóico da superfície do pneumococo (Fig. 3). Como esta porção está encoberta pela cápsula, anticorpos contra ela não se mostram protetores.

O domínio alfa-hélice compreende 40% da região N-terminal da molécula. A porção positiva desse domínio parece interagir com a carga negativa do PS capsular e sua porção negativa, ao contrário, é repelida pelo PS. Desta forma, o domínio alfa-hélice ganha uma forma estendida na superfície do pneumococo e expõe uma porção da PspA na superfície da bactéria. Essa exposição faz com que anticorpos contra esse domínio exerçam atividade protetora, tornando-o antigênico. A região rica em prolina, logo abaixo do domínio alfa-hélice, “flutua” entre a carga negativa do PS (DANIELS et al., 2006).

Figura 3: Esquema propondo a relação entre a PspA e outras moléculas de superfície do *S. pneumoniae*. A PspA liga-se à parede celular através de seu domínio colina. Sua porção carregada positivamente interage com a porção negativa do PS capsular e determina sua forma estendida e consequente exposição na superfície do pneumococo.

FONTE: Modificado de Daniels et al. (2006).

Devido a sua variabilidade na sequência N-terminal, em especial nos últimos 100 aminoácidos, conhecidos como “região definidora de clado” (CDR), as proteínas PspA tem sido agrupadas dentro de 3 famílias distribuídas em 6 diferentes clados (HOLLINGSHEAD et al., 2000). As PspAs de mesma família apresentam CDR com 55% de homologia, já as proteínas de mesmo clado apresentam mais de 90% de similaridade. A família 1 é composta pelo clado 1 e 2, a família 3 pelos clados 3, 4 e 5 e a família 3 somente pelo clado 6. 94-99% das PspA isoladas clinicamente são encontradas entre famílias 1 ou 2 das cepas de *S. pneumoniae* (BRANDILEONE et al., 2004; HOLLINGSHEAD et al., 2006; PIMENTA et al., 2006). Estudos têm mostrado que membros da mesma família apresentam maior reatividade cruzada entre si (MIYAJI et al., 2002; GOULART et al., 2011).

Neste trabalho serão utilizadas representantes das duas principais famílias: uma PspA família 1 clado 1 (PspA1) e uma PspA família 2 clado 3 (PspA3).

1.4.2 Polissacarídeo Capsular Sorotipo 6B (PS6B)

Entre as cepas de maior prevalência associadas à doença pneumocócica no Brasil estão as cepas sorotipo 1, 6B e 14, sendo que as cepas 6B e 14 mostram-se altamente resistentes à ampicilina (BRANDILEONE et al., 2003). Além de sua importância epidemiológica no cenário brasileiro, o PS6B se destaca como um dos sorotipos líderes no cenário mundial (HAUSDORFF; SIBER; PARADISO, 2009; DUGGAN, 2010).

O PS6B é composto por unidades monoméricas de α -D-Galp(1-3)- α -D-Glcp(1-3)- α -L-Rhap(1-4)-D-Ribitol-5-PO₄. A figura 4 ilustra esta unidade monomérica. Devido à alta similaridade estrutural entre o PS6B e o PS sorotipo 6A de *S. pneumoniae* (Fig. 5), anticorpos anti-PS6B também mostram uma proteção contra cepas sorotipo 6A (embora inferior a oferecida contra cepas 6B) (HAUSDORFF; SIBER; PARADISO, 2009; PARK et al., 2008).

Figura 4: Unidade monomérica do polissacarídeo capsular sorotipo 6B.

Figura 5: Unidade monomérica do polissacarídeo capsular sorotipo 6A.

O Sorogrupo 6 tem sido reportado como o terceiro mais relacionado a doenças invasivas (ROBINSON et al., 2002) e tem sido foco de trabalhos recentes devido ao surgimento de dois novos sorotipos o 6C (PARK et al., 2007b) e o 6D (KUCH et al., 2010).

1.4.3 Conjugação entre PS e Proteína

Os dois métodos de conjugação mais utilizados são: **1)** oxidação de hidroxilas vicinais da molécula de açúcar a aldeído, seguida pela reação conhecida como Aminoação Redutiva (reação dos grupos aldeídicos com as aminas presentes na molécula da proteína) (LAFERRIERE et al., 1997) e **2)** ativação das hidroxilas vicinais do açúcar por brometo de cianogênio (CNBr) seguida de reação com espaçadores como a dihidrazida do ácido adípico (ADH). Os grupos NH_2 inseridos no açúcar reagem com os grupos carboxilas presentes na proteína na presença de uma carbodiimida (SCHNEERSON et al., 1986). As vacinas conjugadas atualmente no mercado, salvo raras exceções, utilizam um desses dois métodos de conjugação. A Prevenar[®] e a vacina MCC[®] (antimeningocócica C- CRM197), por exemplo, empregam o primeiro método, já a vacina Hiberix[®] (Hib-Toxóide tetânico) é preparada pelo segundo método.

Recentemente vêm sendo publicados novos métodos tais como: **1)** tetrafluoroborato de 1-ciano-4-dimetilaminopiridina (SHAFFER et al., 2000); **2)** utilização de derivativos de aminoxi como espaçador entre a proteína e o PS (LEES et al., 2006); **3)** oxidação do PS para obtenção de grupos aldeídicos e ativação da proteína com a hidrazina para a ligação de ambos (SILVEIRA et al., 2007). Esses três últimos métodos parecem apresentar maior rendimento embora os autores não demonstrem em números. Entretanto, os dois primeiros métodos citados nesse parágrafo (1 e 2) têm como desvantagem o custo dos reagentes empregados no processo de síntese.

Um método novo, resultante da fusão entre os métodos clássicos (LAFERRIERE et al., 1997; SCHNEERSON et al., 1986), foi otimizado e testado em nosso laboratório (LORTHIOIS, 2007; CSORDAS et al., 2008). Neste novo método, excluíram-se as etapas desfavoráveis presentes nas metodologias clássicas, como a utilização do brometo de cianogênio – reagente tóxico e instável, e a reação com o ϵ - amino grupo da lisina, cuja velocidade de reação é lenta e o rendimento baixo. Neste método o PS é oxidado para a obtenção de grupos aldeídicos e ligado a uma dihidrazida para a obtenção de uma ligação hidrazona. Os grupos NH_2 se ligam à carboxila da proteína em uma reação mediada por uma carbodiimida, EDAC

(hidrocloro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida). Entretanto, dada a elevada suscetibilidade à hidrólise do agente ativador EDAC, resolvemos avaliar o potencial do reagente cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM) como agente ativador na reação de conjugação acima descrita. O uso do DMT-MM tem sido proposto para a formação de carboxamidas em reações com moléculas orgânicas pequenas (KUNISHIMA et al., 2001) ou para ativação de grupos carboxilatos presentes em polissacarídeos com o objetivo de conjugá-los com moléculas orgânicas (SCHLOTTMANN et al., 2006; FARKAS e BYSTRICKY, 2007), contudo sua aplicação na síntese de antígenos vacinais é inédita e será um dos focos de estudo desse trabalho.

Tendo como objetivo o aumento da cobertura vacinal, nosso grupo vem trabalhando no desenvolvimento de vacinas antipneumocócicas conjugadas empregando como carreador a proteína do próprio pneumococo, a PspA. Estudos realizados com o conjugado composto pela PspA ligada ao PS sorotipo 23F de *S. pneumoniae* mostraram que a conjugação foi capaz de potencializar a resposta imune protetora desencadeada contra a PspA (CSORDAS et al., 2008). Porém, como a resposta imune induzida contra a proteína carreadora pode ser afetada pelo tipo de PS conjugado a ela (MCCOOL et al., 1999; KAMBOJ et al., 2003; LEONARD et al., 2003) é importante que sua imunogenicidade seja estudada após conjugação com cada sorotipo.

No trabalho aqui apresentado foram produzidos diferentes conjugados envolvendo a ligação do PS6B à proteína PspA1 ou à proteína PspA3. Além da análise da resposta imunológica desencadeada pelo conjugado para ambos os imunógenos (PS6B e PspA), também foi avaliada a influência do tamanho dos espaçadores entre o PS e a proteína sobre a apresentação ao sistema imune. De forma resumida, esse trabalho apresenta: 1) a produção de uma vacina conjugada diferente das comumente encontradas no mercado, uma vez que há o interesse na resposta induzida contra o carreador, neste caso a PspA, proteína do próprio pneumococo; 2) o uso de um método diferente de conjugação; 3) a influência da estrutura química do conjugado na resposta imunológica.

2 OBJETIVOS

Estabelecer protocolos de conjugação entre a PspA e o PS6B com atenção aos rendimentos reacionais atingidos, bem como avaliar a influência da conjugação sobre a imunogenicidade da PspA e do PS6B.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento desse projeto pode ser dividido em duas etapas: I- Síntese dos Conjugados e II- Avaliação da Resposta Imune Induzida. A figura 6 mostra de forma esquemática as etapas para obtenção dos conjugados, enquanto a figura 7 representa os ensaios imunes efetuados.

Figura 6: Etapas para obtenção dos diferentes conjugados.

* A PspA teve suas lisinas protegidas por reação com formaldeído com o objetivo de evitar reações inter e intramoleculares e, assim, aumentar o rendimento da conjugação (PspA mod).

Figura 7: Análise da resposta imune. * Quantificação de anticorpos IgG anti-PS6B e anti-PspA. ** Análise da deposição de complemento e atividade opsonofagocítica para cepas PspA clado 1 ou clado 3.

3.1 Preparação do PS6B para Conjugação

3.1.1 Hidrólise do PS6B

O PS6B (12 mg/mL), produzido e purificado pela doutora Talita Carmo (CARMO, 2010), foi hidrolisado pela adição de ácido clorídrico (HCl) 0,5 M e aquecimento à 80 °C sob refluxo e agitação durante 1 hora. A hidrólise foi interrompida pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) até a neutralização (pH=7,5) e o tamanho do PS determinado por cromatografia de gel-filtração em Sephacryl™-S400 (GE Healthcare, Uppsala Sweden).

3.1.2 Oxidação do PS6B

O PS6B hidrolisado (10 mg/mL) foi oxidado com metaperiodato de sódio (NaIO_4) 10 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) na presença de tampão fosfato de sódio 10 mM por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro. A reação foi finalizada pela adição de glicerol (USB® Corporation, Cleveland, OH) (10 µL por mL de reação) e o PS purificado através de cromatografia de gel filtração em Sephadex™-G25 (GE Healthcare, Uppsala Sweden).

3.1.3 Derivatização do PS6B com Diidrazida do Ácido Adípico (ADH)

O PS6B oxidado (10,0 mg/mL) foi incubado por 24 horas com diidrazida do ácido adípico (ADH) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) na proporção de 50 vezes o número de moles de aldeído. Utilizou-se como meio reacional uma solução fosfato de sódio 10 mM (pH=7,5), acrescido de cianoboroidreto de sódio (NaBH_3CN) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) na proporção de 50 vezes o número de moles de aldeído. A reação foi interrompida pela adição de 10 µL (por mL de reação) de uma solução 5M de boroidreto de sódio (NaBH_4) em NaOH 0,2%. O produto obtido PS6B-ADH foi purificado por cromatografia de gel filtração em Sephadex™-G25 (GE Healthcare).

3.1.4 Derivatização do PS6B com 1,8 Diaminooctano (OCT)

O PS6B oxidado (10,0 mg/mL) foi incubado por 48 horas com 1,8 diaminooctano (OCT) (Aldrich, St Louis, MO) na proporção de 50 vezes o número de moles de aldeído em meio contendo fosfato de sódio 100 mM (pH=8,5), acrescido de cianoboroidreto de sódio (NaBH_3CN) na proporção de 100 vezes o número de moles de aldeído. A reação foi cessada pela adição de 10 μL de uma solução 5 M de boroidreto de sódio (NaBH_4) em NaOH 0,2% (para cada mL de mistura reacional). O produto obtido PS6B-OCT foi purificado por cromatografia de gel filtração em SephadexTM-G25 (GE Healthcare).

3.2 Preparação da PspA para Conjugação

3.2.1 Obtenção da PspA1 e PspA3

A PspA 1 e a PspA3 clonadas e inseridas em *E. coli* B121(DE3) usando os vetores pET-*pspA1* e pET-*pspA3* foram fornecidas pelo laboratório da Dra. Luciana Leite. O cultivo e a purificação das duas proteínas foram realizados no Laboratório de Fermentação (SILVA et al., 2007; CARVALHO JR, 2009).

3.2.2 Proteção dos resíduos de lisina presentes na PspA

A proteção dos resíduos de lisina presentes na PspA foi feita via reação com formaldeído. Para isso utilizou-se formaldeído na concentração de 5% v/v na presença de cianoboroidreto de sódio 5 M dissolvido em NaOH 1 M (10 μL por mL de reação) e tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH=8,0). A reação ocorreu por um período de 4 dias, após o qual foi feita cromatografia de gel filtração em SephadexTM-G25 (GE Healthcare) para eliminação do excesso de reagentes.

3.3 Conjugação

3.3.1 Conjugação pelo Método de Aminoação Redutiva

A conjugação foi realizada adicionando-se PS6B, PspA1 ou PspA3 e NaBH_3CN (dissolvido em NaOH 0,05 M com $\text{pH}=8,0$) na proporção de 1:1:2, e incubando-se essa mistura por 17 dias à 25 °C sob agitação constante.

3.3.2 Conjugação utilizando EDAC como ativador

A proteína (PspA 1 ou PspA3) foi ativada com hidrocloreto de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida (EDAC) (Sigma, St Louis, MO) e incubada com PS6B-ADH. Para a eliminação do excesso de EDAC, ou seu produto de hidrólise EDU, a mistura reacional foi dialisada contra uma solução 0,1 M de NaCl e 10 mM de fosfato de sódio ($\text{pH}=7,5$). Várias condições reacionais foram testadas na tentativa de melhorar o rendimento: 1) emprego de diferentes soluções tampão - fosfato de sódio (10 mM ou 40 mM) ou tampão MES (100 mM); 2) concentrações variadas de PS-ADH (1 a 20 mg/mL); 3) concentrações variadas de PspA (1 a 15 mg/mL); 4) diferentes concentrações de EDAC (0,1 M ou 0,3 M) e 5) diferentes tempos de incubação (4h – 48h).

3.3.3 Conjugação utilizando DMT-MM como ativador

A proteína (PspA 1 ou PspA3) foi ativada com 0,1 M de cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM) (Aldrich, St Louis, MO) e incubada com PS6B-ADH ou PS6B-OCT. O excesso de DMT-MM que não reagiu, foi eliminado por diálise contra uma solução 0,1 M de NaCl e 10 mM de fosfato de sódio ($\text{pH}=7,5$). Várias condições reacionais foram testadas na tentativa de melhorar o rendimento: 1) emprego de diferentes soluções tampão - fosfato de sódio (10 mM ou 40 mM) ou tampão borato de sódio (50 mM); 2) concentrações variadas de PS-ADH ou PS-OCT (2,5 a 10 mg/mL); 3) concentrações variadas de PspA (2,5 a 15 mg/mL); 4) diferentes tempos de incubação (24h ou 48 h).

3.4 Ensaios Imunológicos

3.4.1 Cepas de *Streptococcus pneumoniae*

As cepas de *S. pneumoniae* empregadas nesse trabalho foram cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz. As cepas foram mantidas em meio Todd-Hewitt (BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J., USA) suplementado com 0.5% de extrato de levedura (THY) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO., USA) contendo 10% de glicerol (USB) e estocadas à -80 °C.

3.4.2 Esquema de Imunização

Camundongos Balb/c fêmeas de 8 semanas fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan ou comprados do Biotério da UNIFESP foram imunizados por via intraperitoneal num esquema de 3 doses de 0,5 mL em intervalo de 14 dias. Foi realizada sangria por via retro-orbital no 13º, 27º e 41º dias após a 1ª imunização. A tabela 1 mostra os ensaios efetuados bem como as doses empregadas.

3.4.3 Quantificação de Anticorpos Anti-PspA

No ELISA para detecção de anticorpos anti-PspA foram empregadas placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc International, Rochester, NY), as quais foram sensibilizadas com 100 µL/poço de uma solução de PspA 1 µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato pH=9,6 e incubadas por 24 h à 4 °C. Após o *coating* as placas foram bloqueadas com uma solução de leite desnatado Molico® (Nestlé, São Paulo, Brasil) 10% por 1 h à 37 °C. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e incubadas por 1 h à 37 °C com 100 µL do soro previamente diluído. Após nova lavagem com PBS-T, adicionou-se 100 µL/poço de uma solução contendo anticorpo *anti-mouse* conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) diluído 1:1000 e incubou-se por 1 h à 37 °C. Na etapa final, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas por 15 min à T.A. no escuro com 100 µL de uma solução contendo 270 µg/mL de fenildiamina (Sigma-

Aldrich, St Louis, MO) e 5 µL/mL de peróxido de hidrogênio 3% em tampão citrato 0,1 M. A reação foi cessada com 50 µL de ácido sulfúrico 4 M e a absorbância medida a 490 nm utilizando o leitor de placas Multiskan EX (Labsystems Uniscience) (FUKASAWA et al., 1999). O título de anticorpos foi determinado como sendo a diluição na qual se obtém uma D.O. 0,1.

Tabela 1- Esquema de Imunização para teste dos diferentes conjugados

Exper.	Grupos	PS(µg)/dose	PspA(µg)/dose	Al(OH) ₃ (µg)/dose	nº de animais
I	Salina	0	0	200	5
	PS6B + PspA3 (coad.)	5	5	200	10
	Conj. PS6B-oxi-PspA3	5	22	200	10
	Conj. PS6B-ADH-PspA3	5	7,3	200	10
	Conj. PS6B-OCT-PspA3	5	19	200	10
	Prevenar®	0,8	0	200	5
II	Salina	0	0	200	5
	PS6B + PspA1 (coad.)	5	5	200	10
	Conj. PS6B-oxi-PspA1	5	5	200	10
	Conj. PS6B-ADH-PspA1	5	5	200	10
	Prevenar®	0,8	0	200	5
III	Salina	0	0	200	6
	PS6B + PspA3 (coad.)	1	5	200	6
	PS6B + PspA3 mod (coad.)	3	5	200	6
	Conj. PS6B-oxi-PspA3	1,1	5	200	6
	Conj. PS6B-ADH-PspA3mod	3	5	200	6
	Conj. PS6B-OCT-PspA3mod	2,4	0	200	6
	Prevenar®	0,8	0	200	6
IV	Salina	0	0	50	3
	PS6B + PspA3 (coad.)	40	25	50	5
	Conj. PS6B-ADH-PspA3mod	4	2.5	50	5
	Conj. PS6B-ADH-PspA3mod	40	25	50	5
V	Salina	0	0	50	6
	PS6B + PspA3 (coad.)	30	56	50	6
	PS6B + PspA3 mod (coad.)	30	20	50	6
	Conj. PS6B-oxi-PspA3	30	56	50	6
	Conj. PS6B-ADH-PspA3mod	30	20	50	6
	Conj. PS6B-6OCT-PspA3mod	30	18	50	6
	Conj. PS6B-ADH-T.T.	30	0	50	6
VI	Salina	0	0	50	6
	PS6B + PspA1 (coad.)	15	45	50	6
	PS6B + PspA1 mod (coad.)	15	21	50	6
	Conj. PS6B-oxi-PspA1	15	48	50	6
	Conj. PS6B-ADH-PspA1mod	15	11	50	6
	Conj. PS6B-OCT-PspA1mod	15	30	50	6

3.4.4 Quantificação de Anticorpos Anti-PS6B

Para a determinação de anticorpos IgG anti-PS6B placas de 96 poços Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com 100 μ L de uma solução 50 μ g/mL de PS6B em tampão carbonato/bicarbonato pH=9,6 por 48 h à 4 °C. Após o *coating* a placa foi bloqueada com uma solução de leite desnatado Molico® 10% por 1 h à 37 °C. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e incubadas por 2 h à 37 °C com 100 μ L do soro previamente diluído e adsorvido com PSC (15 μ g/mL de soro durante 30 min). Após nova lavagem com PBS-T, adicionou-se 100 μ L/poço de uma solução contendo anticorpo *anti-mouse* conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich) diluído 1:1000 e incubou-se por 1 h à 37 °C. Na etapa final, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas por 15 min à T.A. no escuro com 100 μ L de uma solução contendo 270 μ g/mL de fenildiamina (Sigma-Aldrich) e 5 μ L/mL de peróxido de hidrogênio 3% em tampão citrato 0,1 M. A reação foi cessada com 50 μ L de ácido sulfúrico 4 M e a absorbância medida a 490 nm utilizando o leitor de placas Multiskan EX (FUKASAWA et al., 1999). O título de anticorpos foi determinado como sendo a diluição na qual se obtém uma D.O. 0,1.

3.4.5 Quantificação dos Isotipos IgG1 e IgG2a anti-PspA

Para a determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PspA utilizou-se como *coating* 100 μ L de uma solução de PspA 1 μ g/mL em tampão carbonato/bicarbonato pH=9,6, por 24 h à 4 °C. Após o *coating* a placa foi bloqueada com uma solução de leite desnatado Molico® 10% por 1 h à 37°C. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-Tween 0,05% (PBS-T) e incubadas por 1 h à 37 °C com 100 μ L do soro previamente diluído. Após nova lavagem com PBS-T, adicionou-se 100 μ L/poço de uma solução contendo anticorpo *anti-mouse* IgG1 ou IgG2a (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) diluído 1:1000 e incubou-se por 1 h à 37 °C. Seguiu-se nova etapa de lavagem com PBS-T, e adicionou-se 100 μ L/poço de uma solução contendo anticorpo *anti-goat* conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) diluído 1:20000 seguido de incubação por 1 h à 37 °C. Na etapa final, as placas foram

lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas por 15 min à T.A. no escuro com 100 µL de uma solução contendo 270 µg/mL de fenildiamina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e 5 µL/mL de peróxido de hidrogênio 3% em tampão citrato 0,1 M. A reação foi cessada com 50 µL de ácido sulfúrico 4 M e a absorbância medida a 490 nm utilizando o leitor de placas Multiskan EX (FUKASAWA et al., 1999). O título de anticorpos foi determinado como sendo a diluição na qual se obtém uma D.O. 0,1.

3.4.6. Ensaio de Deposição de Complemento

Previamente os *pools* dos soros dos camundongos imunizados tiveram seu complemento inativado por incubação a 56 °C por 30 min. As bactérias, crescidas em *Todd-Hewitt* até a concentração de aproximadamente 10^8 CFU/mL, foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 g e 4 °C. Os *pellets* obtidos foram lavados e ressuspensos com PBS. Amostras de 100 µL foram incubadas por 30 min a 37°C na presença de 10% de soro. Após incubação seguiu-se uma nova lavagem com PBS, sendo os *pellets* ressuspensos em 90 µL de tampão gelatina veronal e incubados a 37 °C por 30 minutos com 10% de soro normal de camundongo (fonte de complemento). Após lavagem com PBS foi realizada incubação com 100 µL de anticorpo anti-C3 de camundongo conjugado ao FITC (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), na diluição de 1:500 em gelo, por 30 min no escuro. Finalmente a bactéria foi lavada duas vezes com PBS e ressuspensa em 2% de formaldeído e estocada a 4 °C no escuro até a análise por citometria de fluxo usando o equipamento FACs Canto (BD Biomedicals). Resultados apresentados como Índice de Fluorescência (IF) dado pela porcentagem de bactérias positivas multiplicada pela média da intensidade de fluorescência (FITC⁺) (HYAMS et al., 2010).

3.4.7 Ensaio de Opsonofagocitose

Os *pools* dos soros dos camundongos imunizados tiveram seu complemento inativado por incubação a 56 °C por 30 min. As bactérias crescidas em *Todd-Hewitt* até a concentração de aproximadamente 10^8 CFU/ mL foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 g e 4 °C. Os *pellets* obtidos foram lavados e ressuspensos com

tampão Hank's (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Amostras de 100 μL (10^8 CFU/mL) foram incubadas por 30 min a 37 °C na presença do *pool* dos soros em teste (diluções 1:8 ou 1:16). Após incubação foi acrescido 10% de soro normal de camundongo como fonte de complemento e seguiu-se uma nova incubação a 37 °C por 30 min. Após lavagem com PBS foi realizada incubação à 37 °C por 45 min com 4×10^5 células peritoneais em um volume final de 100 μL . As células peritoneais utilizadas nessa etapa foram coletadas através da lavagem do peritônio de camundongos com 5 mL de PBS gelado seguida de centrifugação a 1000 g. Esses camundongos foram previamente estimulados (48 h antes do ensaio) com 10 μg de concanavalina (ConA) de *Canavalia ensiformis* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) (GOULART et al., 2011).

Após o término da incubação (45 min) a reação foi interrompida em gelo por 5 minutos e as amostras diluídas em PBS para plaqueamento em ágar sangue. A fagocitose foi determinada pela contagem de *S. pneumoniae* viáveis após 20 h.

3.4.8 Ensaio de Exposição de Epítomos

Para avaliar a exposição de epítomos dos imunógenos nos conjugados foram utilizados como *coating* 100 μL por poço de: 1) solução contendo 5 $\mu\text{g/mL}$ de conjugado; 2) solução 1 $\mu\text{g/mL}$ de PspA ou 3) solução 50 $\mu\text{g/mL}$ de PS6B, todos diluídos em tampão carbonato/bicarbonato pH=9,6. As placas foram incubadas por 24 h à 4 °C e em seguida bloqueadas com uma solução de leite desnatado Molico® 10% por 1 h à 37 °C. Após 3 lavagens com solução PBS-Tween 0,05% (PBS-T) as placas foram incubadas por 1h à 37 °C com 100 μL de soro anti-PS6B diluído 1:500 (produzido por cabra após imunização com a Prevenar®) ou com 100 μL de soro anti-PspA diluído 1:1000 (produzido por camundongos imunizados com a PspA nativa). Após nova lavagem com PBS-T, adicionou-se 100 μL /poço de uma solução contendo anticorpo *anti-mouse* (ou *anti-goat*) conjugado à peroxidase diluído 1:1000 e incubou-se por 1 h à 37 °C. Na etapa final, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas por 15 min à T.A. no escuro com 100 μL de uma solução contendo 270 $\mu\text{g/mL}$ de fenildiamina e 5 $\mu\text{L/mL}$ de peróxido de hidrogênio

3% em tampão citrato 0,1 M. A reação foi cessada com 50 µL de ácido sulfúrico 4 M e a absorbância medida a 490 nm.

3.5 Métodos Analíticos

3.5.1 Quantificação de PS6B pelo método de Fenol-Sulfúrico

Pipetou-se 200 µL da solução contendo o açúcar, em seguida adicionou-se 200 µL de fenol 5% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (Merck) (aplicando-se um jato em direção à superfície do líquido, sem ir contra a parede do tubo). Deixou-se a solução descansando por 10 min em gelo. Após esse tempo, a mistura foi vortexada e incubada por 10 minutos em banho fervente. Os tubos foram resfriados em gelo e deixados à temperatura ambiente por 20 minutos. A leitura foi feita no espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm (DUBOIS et al., 1956). A curva padrão foi feita utilizando ramnose (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) como padrão, com concentrações que variaram de 4 µg/mL a 200 µg/mL.

3.5.2 Quantificação de aldeído

O método empregado é conhecido como BCA e baseia-se na habilidade do aldeído e da proteína em reduzir Cu^{2+} para Cu^{+} formando um complexo quelante com o ácido bicinchonínico (BCA) (TYLLIANAKIS et al., 1994). 100 µL de amostra (diluída em tampão carbonato/bicarbonato 0,1 M pH=10,8) foi adicionado em microplacas sobre os quais se acrescentou 100 µL de uma solução contendo BCA e sulfato de cobre 4% (50:1 v/v) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). A microplaca foi incubada por 40 minutos a 80 °C. Após atingir a T.A. as amostras foram lidas em espectrofotômetro para placas em comprimento de onda de 595 nm. Como padrão foi utilizada glicose em concentrações que variaram de 10 µM a 300 µM.

3.5.3 Quantificação de proteína

A quantificação de proteína foi feita utilizando o protocolo para o ensaio em placas de 96 poços sugerido pelo fabricante do Bradford (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). 5 μ L de amostra foi adicionado à placa, seguido da adição de 250 μ L do reagente Bradford e homogeneização. As amostras foram incubadas por 15 min a T.A. e lidas em espectrofotômetro para placas em comprimento de onda de 595 nm. Como padrão foi utilizada albumina em concentrações que variaram de 0,1-1,4 mg/mL.

3.5.4 Quantificação de Aminas e Hidrazidas – Método TNBS

A quantificação de aminas e hidrazidas foi feita pelo método do ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfônico (TNBS) (QI et al., 1988) com algumas modificações. Em microplacas 50 μ L de amostra foi incubada com 50 μ L de uma solução de borato de sódio 0,2 M (pH=8) por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 50 μ L de uma solução de TNBS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a 1% (v/v) e incubou-se por 30 minutos à T.A. no escuro. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 450 nm para quantificação de aminas e a 490 nm no caso de quantificação de hidrazonas. A curva padrão foi determinada empregando-se ADH em concentrações que variaram entre 5 μ g/mL a 100 μ g/mL para a quantificação de hidrazonas ou empregando-se 1,8 diaminooctano em concentrações que variaram de 50 μ g/mL e 1000 μ g/mL para a quantificação de aminas.

3.5.5 Cromatografia por Gel-Filtração (ou exclusão molecular)

Essa técnica foi utilizada nesse trabalho para a determinação do tamanho do PS bem como para eliminação de reagentes colocados em excesso e/ou subprodutos. As resinas empregadas variaram com a faixa de separação necessária para cada caso. Assim, para a detecção do tamanho do PS trabalhou-se com a resina SephacrylTM S-400 (GE Healthcare), utilizando diversos dextrans como padrões de peso molecular (6, 10, 40, 70, 230 e 2000 KDa) (Sigma-Aldrich,

Steinheim, Sweden). Já para a purificação de amostras em que se desejou separar produtos de alto peso molecular de moléculas de baixo peso molecular utilizou-se a resina Sephadex G-25 (GE Healthcare). O fluxo de trabalho foi de 1 mL/min para a coluna S-400 e de 10 mL/min para a coluna G-25 utilizando o sistema Akta Prime. O tampão empregado e o volume de coleta variaram com a amostra.

3.5.6 Cromatografia Hidrofóbica

O conjugado foi purificado por cromatografia hidrofóbica em resina de Phenyl Sepharose 6 Fast Flow High Sub (GE Healthcare) e eluído em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M sob fluxo de 3 mL/min.

3.5.7 HPLC

Análises do perfil de eluição de dextrans de diversos pesos moleculares (6, 10, 40, 70, 230 e 2000 KDa) (Sigma-Aldrich), do PS6B nativo, oxidado, derivatizado com ADH e conjugado foram realizadas envolvendo duas colunas de gel filtração TSK-gel GMPWXL (Tosoh Bioscience) acopladas. Foi utilizado tampão fosfato 10 mM pH=7,5 para eluição. A corrida foi feita sob fluxo de 0,4 mL/min e duração de 70 minutos.

3.5.8 Determinação dos pontos de oxidação do PS6B

O PS6B, oxidado e não oxidado, foi hidrolisado com ácido trifluoracético (TFA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 2 M em sistema fechado sob agitação por 2 h. O TFA foi eliminado através de rotoevaporação a 60 °C. O produto foi dissolvido em acetonitrila:água (85:15 v/v) (concentração final de 1,5 mg/mL) e analisado por HPLC, empregando-se a coluna Supelcosil LC-NH₂ (Supelco), acetonitrila:H₂O (85:15 v/v) como fase móvel, fluxo de 1mL/min e como detectores o UV em 205 nm e o RID. Os monossacarídeos glicose, galactose, ramnose, frutose e xilitol (Sigma, St Louis, MO) foram utilizados na construção da curva de calibração, sendo

a frutose, por seu tempo de eluição distinto dos demais, empregada como padrão interno.

3.5.9 Eletroforese SDS-PAGE

A eletroforese de proteínas foi realizada utilizando-se o sistema de eletroforese vertical, com o auxílio do equipamento *Electrophoresis Power Supply* EPS301 (GE Healthcare) de acordo com Laemmli (1970). A visualização das bandas protéicas foi realizada por coloração com *Coomassie Blue* e a detecção de polissacarídeos por coloração com Reagente de Schiff.

3.5.10 Eletroforese Bi-dimensional

Para as análises bi-dimensionais da PspA empregou-se 30 µg de PspA acrescida de 1,25 µL de tampão anfótero e tampão de amostra suficiente para completar o volume para 125 µL (tampões presentes no *Immobliline DryStrip Kit* – GE Healthcare). Essa amostra foi aplicada sobre uma fita *drystrip* de 7 cm e pH 4-7 passando por um período de hidratação de 24 h. Após esse tempo seguiu-se uma etapa de focalização por 5h. A fita foi então submetida a tratamento com tampão de equilíbrio (Tris-HCl 1 M, pH=8,4, uréia 6 M, glicerol 30%, SDS 2%) acrescido de DTT (ditioltreitol) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), seguido de tampão de equilíbrio acrescido de iodoacetamida (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Após esse tratamento reducional a fita foi cuidadosamente aplicada sobre uma matriz de poliacrilamida 10% e submetida a corrida num sistema de SDS-PAGE. Após a corrida o gel foi corado com Coomassie-Blue.

3.5.11 Análise por Dicroísmo Circular

Os espectros de CD foram obtidos no espectropolarímetro J-810 (Jasco), em comprimentos de onda que variaram entre 185 e 260 nm. As amostras foram analisadas em tampão fosfato de sódio dibásico 10 mM (pH = 7,5) a 20 °C. Cada

espectro apresentado é a média de cinco mensurações repetidas sobre cada amostra, e os dados obtidos foram reportados como elipicidade molar ($\text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$) (CRANE; BOLGIANO; JONES, 1997; JEDRZEJAS; LAMANI; BECKER, 2001; KELLY; JESS; PRICE, 2005; KREISMAN et al., 2007). O algoritmo CDSSTR foi utilizado para realizar a deconvolução dos espectros obtidos (JOHNSON, 1999).

3.5.12 Análise Estatística

A análise da diferença entre grupos utilizou como teste paramétrico a Análise de Variância (ANOVA) fator único, seguido pelo teste de Tukey. Em todas as análises adotou-se como nível de significância $p < 0.05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Preparação do PS6B para Conjugação

4.1.1 Hidrólise

A hidrólise do PS6B é importante para reduzir a viscosidade, eventualmente facilitar a purificação, e aumentar os pontos de ligação via resíduos terminais. Além disso, há relatos de que a resposta imune desencadeada pelo organismo contra o polissacarídeo é dependente do seu tamanho, sendo observada uma boa resposta para fragmentos entre 10 e 30 subunidades (KNISKERN et al., 1994).

A estrutura do PS6B e os locais passíveis de sofrer hidrólise estão representados abaixo (Fig. 8).

Figura 8: Unidade Monomérica do polissacarídeo capsular sorotipo 6B (PS6B). Setas em azul apontam os locais susceptíveis à hidrólise ácida.

Para determinarmos as condições ideais para hidrólise do PS6B, partimos do protocolo previamente estabelecido para o PS capsular sorotipo 23F de *S. pneumoniae* (CSORDAS et al., 2008). Essa condição inicial, funcional para o PS23F, não teve bom resultado com o sorotipo 6B, e a partir dela, alteramos algumas variáveis com o intuito de estabelecer um protocolo aplicável a esse sorotipo (Tabela 2 e Fig. 9).

Tabela 2 - Condições utilizadas no ensaio de hidrólise do PS6B e seus respectivos resultados.

Condições	Ensaio I	Ensaio II	Ensaio III	Ensaio IV
PS6B (mg/mL)	10	10	10	10
pH	2,0*	1,0*	11,0**	11,0**
Volume total (mL)	10	10	10	10
Temperatura (°C)	80	80	80	80
Agitação	SIM	SIM	SIM	SIM
Tempo (h)	3	6	4	8
Resultado: Hidrólise	NÃO	PARCIAL	NÃO	NÃO

* Meio contendo HCl

** Meio contendo NaOH

Figura 9: Perfil Cromatográfico do PS6B em diferentes condições hidrolíticas - Coluna Sephacryl S-400 em sistema Akta Prime. Fase móvel: NaCl 0,2 M (1 mL/min).

Frente à dificuldade de quebra do PS6B, buscamos na literatura protocolos de hidrólise mais agressivos capazes de reduzir o número de subunidades e dar seguimento ao processo de conjugação. Ip et al. (1992) estabeleceu um protocolo de hidrólise utilizando ácido trifluoracético (TFA) sob alta temperatura para promover a hidrólise total de diversos PS e, desta forma, determinar a composição destes.

Em seu trabalho Ip et al. (1992) comenta sobre a drástica diferença apresentada pelos PS quanto à labilidade ácida. A ligação Gal-PO₄ é muito mais susceptível à hidrólise por TFA do que a ligação ribitol-PO₄. Além disso, as moléculas vizinhas parecem exercer grande influência sobre essa suscetibilidade. Exemplo disso é a ligação ribitol-PO₄ do polissacarídeo PRP de *Haemophilus influenza*, a qual é muito mais fácil de ser hidrolisada do que a mesma ligação no PS6B. Outro exemplo de como pequenas mudanças na estrutura podem alterar totalmente a estabilidade de um PS é o caso do PS6A e do PS6B de *S. pneumoniae*. Esses dois polissacarídeos são isoméricos, no entanto, em pH 10 a 60 °C o PS6A mostra-se 1000 vezes menos estável do que o PS6B. Quando submetido a pH 10, temperatura de 60 °C, na presença de um agente caotrópico (Ca⁺⁺) o PS6B demora 5 anos para ter sua massa molecular reduzida pela metade, enquanto o PS6A demora apenas 37 horas, mostrando-se bem mais susceptível a hidrólise.

As condições sob as quais foram realizados os ensaios com o ácido trifluoracético (TFA) como agente hidrolítico estão expostas abaixo (Tabela 3) e os perfis cromatográficos para os respectivos produtos de cada ensaio estão mostrados na Figura 10.

Como nosso objetivo é atingir um tamanho entre 10 e 20 subunidades, o que corresponderia a uma eluição entre 126 e 138 mL (região de depressão no gráfico - destacada em laranja na Figura 10) observamos que o emprego do TFA foi ineficiente na geração de PS nessa faixa de massa molecular. Novos testes envolvendo ácido clorídrico e ácido acético, em diversas concentrações, tempo e temperaturas de reação permitiram o estabelecimento do protocolo de hidrólise descrito em "Materiais e Métodos". O procedimento empregado permitiu a redução da massa do PS6B de 1000 KDa para 20 KDa (Fig. 11).

Tabela 3 - Condições utilizadas no ensaio de hidrólise do PS6B com TFA

Condições	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4
PS (mg/mL)	1	1	10	10
TFA (mol/L)	2,0	2,0	2,0	2,0
Volume total (mL)	10	10	10	10
Temperatura (°C)	80	80	80	80
Agitação	SIM	SIM	SIM	SIM
Tempo (h)	4	7	7	5,50

Figura 10: Perfil Cromatográfico do PS6B após hidrólise com TFA - Coluna Sephacryl S-400 em sistema Akta Prime. Fase móvel: NaCl 0,2 M (1 mL/min).

Figura 11: Cromatograma do PS6B nativo e hidrolisado. Coluna Sephacryl S-400 em sistema Akta Prime. Fase móvel: NaCl 0,2 M (1 mL/min).

4.1.2 Oxidação

Após a clivagem do PS seguiu-se a introdução de um terminal reativo para posterior ligação com a proteína ou com moléculas espaçadoras. Esse terminal reativo constitui-se de grupos aldeídos gerados no polissacarídeo pela oxidação das hidroxilas vicinais (MORRISON e BOYD, 2005) (Fig. 12). Essa oxidação deve ser branda para que a estrutura do polissacarídeo não sofra muitas alterações e, desta forma, não comprometa o seu reconhecimento pelo sistema imune (HERMANSON, 1996).

Figura 12: Esquema representativo da oxidação de hidroxilas vicinais com consequente formação de grupos aldeídos.

A figura 13 apresenta os possíveis locais de introdução de grupos reativos no PS6B. O protocolo de oxidação estabelecido por nós para o PS6B mostrou-se bastante reprodutível, sendo a relação de aldeído por molécula de PS muito próxima a 5, o que corresponde a menos de 3% das hidroxilas presentes no PS hidrolisado.

Figura 13: Locais passíveis de oxidação por NaIO₄ na molécula de PS6B e os produtos gerados.

4.1.3 Determinação dos pontos de oxidação do PS6B

Para a elucidação da estrutura do conjugado um dos primeiros pontos a ser estudado é o sítio do PS que está sofrendo oxidação, dado que o terminal reativo que se ligará a proteína será inserido nesse sítio. Para tanto, amostras de PS6B oxidado e não oxidado foram totalmente convertidos a monossacarídeos por hidrólise com TFA e analisados por HPLC quanto a sua composição (Fig. 14).

Figura 14: Procedimento de análise para determinação dos sítios de oxidação.

Conforme apresentado anteriormente, os pontos suscetíveis a reação de oxidação no PS6B são a galactose e o ribitol.

Para verificação do perfil de oxidação foi construída uma curva de calibração com os monossacarídeos, o que nos permitiu definir o tempo de eluição de cada um deles e assim avaliar qual deles tinha sua concentração alterada após a oxidação. As análises por HPLC utilizando a coluna Supelcosil™ LC-NH₂ (Supelco) revelaram que não houve alteração na concentração da glicose, da ramnose e da galactose após oxidação, sugerindo que o sítio que sofreu oxidação foi o ribitol. Esta hipótese é reforçada pelo fato do ribitol se tratar de um álcool primário, sofrendo por isso oxidação mais facilmente que alcoóis secundários. Todavia, como não dispúnhamos do padrão ribitol-fosfato não pudemos definir seu tempo de eluição e assim determinar precisamente sua presença ou ausência no PS oxidado.

4.1.4 Derivatização

O PS6B oxidado reagiu diretamente com os grupos aminas da proteína via Aminoação Redutiva (descrito mais adiante), ou foi acoplado a moléculas espaçadoras. Para avaliar a influência do número de carbonos entre o PS e a proteína sobre a apresentação antigênica tanto contra o PS6B como contra a PspA foram empregados espaçadores de diferentes tamanhos. Os espaçadores testados foram: 1) ADH – diidrazida do ácido adípico – que contem um total de 6 carbonos; 2) SAD – diidrazida do ácido sebácico – contendo 10 carbonos em sua estrutura e 3) OCT – diaminoctano – contendo um total de 8 carbonos. A figura 15 esquematiza a reação desses espaçadores com os grupamentos aldeídos introduzidos no PS6B. A reação do PS6B oxidado com as diidrazidas forma uma ligação hidrazona que é reduzida pela adição de cianoboroidreto de sódio (NaBH₃CN).

Figura 15: Reações de derivatização do PS-oxidado com diferentes espaçadores: ADH, SAD e OCT com a posterior adição de NaBH_4 .

A reação de derivatização com o ADH permitiu a inserção de 4 ADHs por molécula de PS e mostrou-se bastante reprodutível. Ao contrário, a derivatização com SAD (diidrazida do ácido sebáico) (Trans World Chemicals, Rockville, MD) não ocorreu. Por conter 10 átomos de carbono, o SAD mostrou-se pouco solúvel em água, em álcool e em diferentes combinações de álcool e água, o que impossibilitou sua reação com o PS.

A derivatização com OCT (diaminooctano), apesar de conter 8 carbonos em sua molécula, não apresentou qualquer dificuldade quanto à solubilidade em água. As condições ótimas de reação foram estabelecidas chegando a um protocolo que empregava o dobro do tempo aplicado para a reação com ADH e o dobro da concentração de cianoboroidreto de sódio. Alguns ajustes no método de detecção foram realizados devido à menor sensibilidade do método de TNBS para detecção de aminas quando comparado a hidrazidas. A relação de OCT por molécula de PS6B ficou entre 3 e 4,5, muito próxima a obtida para o ADH. A figura 16 ilustra os possíveis locais de ligação do ADH e do OCT na molécula de PS6B, lembrando que há em torno de 5 terminais reativos distribuídos entre aproximadamente 30 subunidades monoméricas.

Figura 16: Representação de uma molécula de diidrazida do ácido adípico ligada ao terminal que sofreu oxidação.

4.2 Preparação da PspA para Conjugação

A PspA 1 e a PspA3 recombinantes clonadas e inseridas em *E. coli* B121(DE3) usando os vetores pET-*pspA1* e pET-*pspA3* foram fornecidas pelo laboratório da Dra. Luciana Leite. A PspA clado 1 e a PspA clado 3 recombinantes foram cultivadas e purificadas pelo laboratório de fermentação do Instituto Butantan (SILVA et al., 2007; CARVALHO JR, 2009).

A figura 17 apresenta o perfil eletroforético de diferentes amostras de PspA1 e PspA3. 10 µg de proteína foram injetados no gel para que as bandas de possíveis contaminantes fossem visíveis.

Figura 17: Perfil Eletroforético de diferentes amostras de PspA (clado 1 e clado 3) cedidas pelo Laboratório de Fermentações do Instituto Butantan. Gel de Poliacrilamida 12%. Padrão de alto peso molecular (PM). PspA1: 1-4; PspA3: 5-9.

As amostras de PspA selecionadas para testes de conjugação foram as identificadas com os números 1, 2, 3, 4, 8 e 9 na figura acima, essas amostras apresentavam pureza em torno de 90-95%, sendo que foram fornecidas pelo laboratório de fermentação com concentração em torno de 1-2 mg/mL. As primeiras tentativas de conjugação nessa concentração foram ineficientes. O aumento da concentração é um fator sabidamente que aumenta a velocidade da reação. As amostras foram concentradas por liofilização. Porém, o que observamos é que no caso da PspA3, ao congelarmos as amostras ocorria precipitação irreversível de grande parte da proteína. Intrigados com o fato, principalmente considerando o grau de pureza da amostra fornecida, desconfiamos da possibilidade da existência de contaminantes que coincidentemente apresentavam mesma massa molecular. Para sanar essa dúvida foi efetuada uma Eletroforese Bidimensional, e para nossa surpresa foram detectados vários *spots* na mesma região da massa molecular da PspA3 (Fig. 18).

Figura 18: PspA3. Análise por Eletroforese Bi-dimensional. *Drystrip* de 7 cm e pH 4-7. Gel de poliacrilamida 10%. Padrão de alto peso molecular (PM).

Passada essas observações para o Laboratório de Fermentações, eles adotaram um novo protocolo de purificação. O protocolo, que antes consistia em uma cromatografia de afinidade por níquel seguida de uma cromatografia por Q-Sepharose, passou a empregar 3 cromatografias: Q-Sepharose, Afinidade por níquel e SP-Sepharose. A pureza obtida para a PspA após cada uma dessas cromatografias

foi respectivamente: 70%, 80% e 95% (CARVALHO JR, 2009). Realizamos novas análises por eletroforese-bidimensional com as amostras purificadas por esse novo protocolo e, diferentemente do primeiro, o novo gel mostrou apenas 1 *spot* predominante (Fig. 19 A). Com isso os problemas de precipitação foram sanados permitindo a realização de testes com concentrações mais altas de proteína.

Apesar da proteína PspA1 não ter apresentado problemas durante os processos de congelamento e liofilização, também foi efetuada sua análise bidimensional (Fig. 19 B). O perfil obtido nessa análise foi bastante satisfatório mostrando apenas 1 *spot* predominante.

Figura 19: Análise por Eletroforese Bi-dimensional. A) PspA3; B) PspA1. *Drystrip* de 7 cm e pH 4-7. Gel de poliacrilamida 10%. Padrão de alto peso molecular (PM).

4.3 Conjugação

4.3.1 Conjugação pelo método de Aminoação Redutiva

A conjugação realizada na ausência de espaçadores consiste na reação entre os grupos aldeídos do PS-oxidado com aminas (presente principalmente nos resíduos de lisina) da PspA. Essa reação é denominada Aminoação Redutiva.

Conforme esquematizado na figura 20, neste método, o grupo amina da proteína (A) reage o grupo aldeído presente no PS (B) formando uma dupla ligação C=N (base de Schiff), a qual, na presença de cianoboroidreto de sódio, é reduzida a uma amina secundária, com formação do conjugado (C) (HERMANSON, 1996).

Figura 20: Conjugação pelo método de Aminoação Redutiva. O nitrogênio presente no grupo amina da proteína (A) ataca o carbono deficiente em elétrons do grupo aldeído do PS (B) formando uma base de Schiff, a qual, subsequentemente, é reduzida pela adição de cianoboroidreto de sódio formando o conjugado PS-Proteína (C).

Conjugado PS6B-oxidado-PspA1

O primeiro conjugado desenvolvido por nós foi elaborado pela reação do PS6B oxidado com a PspA1. Após conjugação pelo método de aminoação redutiva descrito acima, seguiu-se uma etapa cromatográfica por gel-filtração em Sephacryl S-400 com o objetivo de purificar o conjugado. O gráfico abaixo (Fig. 21) mostra o perfil obtido para o conjugado, bem como para a PspA1 e para o PS6B-oxidado livres.

De acordo com a figura 21, pode-se verificar que não houve alteração significativa do perfil de eluição dos compostos antes e depois da reação de conjugação, o que não permite afirmar que a conjugação ocorreu, e se ocorreu, a técnica empregada é ineficiente como técnica de purificação.

O mesmo conjugado foi injetado numa coluna de Gel-Filtração para HPLC. Utilizou-se 2 colunas TSKGel GMPWXL acopladas, e novamente não foi possível visualizar o conjugado (resultados não mostrados).

Figura 21: Cromatograma do PS6B-oxidado antes da conjugação (PS-oxid), PS6B após reação de conjugação (PS6B-Conj), PspA1 nativa (PspA1), PspA1 após reação de conjugação (PspA1-Conj). Coluna Sephacryl S-400 em sistema Akta Prime. Fase móvel: NaCl 0,2 M (1 mL/min). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína.

A cromatografia de gel-filtração mostra-se eficiente para a purificação de conjugados cuja massa molecular é bastante distinta dos seus componentes livres. No presente caso, ao contrário, a conjugação foi efetuada com um PS e uma proteína de 20 KDa e 40 KDa respectivamente, o que acabou acarretando a sobreposição dos componentes livres e conjugados. Devido a essa dificuldade em purificar o conjugado por gel filtração, e considerando que: 1) o grande número de hidroxilas presentes no polissacarídeo confere-lhe alto grau de hidrofiliabilidade; 2) a PspA é composta por aproximadamente 36% de resíduos de caráter hidrofóbico; uma alternativa proposta para a análise e purificação do conjugado foi a Cromatografia Hidrofóbica.

Conforme esperado o PS-oxidado não interagiu com a resina empregada (Phenylsepharose 6 *Fast Flow High Sub*) sendo eluído ainda durante o re-equilíbrio com sulfato de amônio 1 M. Já com relação à proteína, tanto a PspA1 como a PspA3, interagiram fortemente com a resina sendo eluídas somente na ausência de sulfato amônio ou concentrações extremamente baixas do sal.

Ao injetarmos a amostra da reação de conjugação feita pelo método de aminação redutiva notamos que uma das frações, contendo tanto PS6B como PspA1 (fração conjugada), eluia durante o gradiente, seguida da eluição da fração livre de

PspA (não conjugada). O perfil obtido para essa cromatografia é apresentado abaixo (Fig. 22).

Figura 22: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-oxidado e a PspA1 pelo método de aminação redutiva. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circundada por linhas pontilhadas.

O rendimento da conjugação entre o PS6B-oxidado e a PspA1, calculado com base na quantidade total de PS6B contida na fração do conjugado em relação à quantidade total de PS6B, foi de 27% e a relação molar entre o PS6B e a PspA1 foi de 1,0 mol de PS6B : 0,5 mol de PspA1, que equivale a uma relação em massa de 1:1 (considerando MM do PS6B como sendo 20 KDa e da PspA1 de 40 KDa).

Conjugado PS6B-oxidado-PspA3

O segundo conjugado sintetizado também empregou o método de aminação redutiva para acoplar o PS6B oxidado com a PspA3. O perfil de eluição desse conjugado por cromatografia hidrofóbica está apresentado abaixo (Fig. 23).

Figura 23: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-oxidado e a PspA3 pelo método de aminação reductiva. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circulada por linhas pontilhadas.

O rendimento do processo de conjugação com relação à quantidade de PS6B foi de 22%, próximo ao valor obtido para o conjugado anterior. A relação molar obtida para o PS6B e a PspA3 foi de 1 mol de PS6B : 2,2 mol de PspA3, que equivale a uma relação em massa de 1:4,4 (considerando MM do PS6B como sendo 20 KDa e da PspA1 de 40 KDa).

4.3.2 Conjugação intermediada pelo EDAC

Conforme descrito anteriormente nosso laboratório tem empregado um método de conjugação que consiste na fusão de dois métodos clássicos com eliminação das etapas desfavoráveis (LORTHIOIS, 2007). Neste método o PS oxidado é ligado a uma molécula espaçadora contendo grupamento amina ou diidrazida. O nitrogênio desses grupos funcionais faz um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico da proteína. Entretanto como os carboxilatos são pouco reativos em água, é necessária sua conversão em um éster reativo via carbodiimida, gerando o intermediário *O*-aciluréia reativo (composto de baixa

energia de ativação). A carbodiimida comumente empregada é o EDAC, cuja participação na reação de conjugação está mostrada abaixo (Fig. 24).

Figura 24: Ativação da proteína pelo EDAC. O grupamento carboxilato da proteína (A) sofre ataque nucleofílico pelo nitrogênio presente no EDAC (B) gerando um intermediário reativo (A-B) que reage com o PS derivatizado com diamina ou hidrazida (C), gerando o conjugado (A-C) e liberando o subproduto oxidado do EDAC – EDU (D).

Embora esse método tenha permitido a obtenção de conjugados entre o PS23F e a PspA1 (CSORDAS et al., 2008) ele não se mostrou eficiente para a conjugação envolvendo o PS6B. Como o EDAC na presença de água é altamente susceptível à hidrólise, apresentando uma meia vida de aproximadamente 2 horas (HERMANSON, 1996) o aumento do tempo de reação como estratégia para aumentar o rendimento reacional não se mostra como uma boa alternativa. O tampão MES (Ácido 2- morfolinoetanossulfônico monohidratado) segundo Vijay e Sehgal (1994) é mais compatível com o intermediário aciluréia gerado pela reação com EDAC, entretanto, o seu emprego favoreceu a precipitação da mistura reacional

e acabamos optando pela reação em tampão fosfato de sódio pH=7,5. Concentrações variadas de PS6B e de PspA foram empregadas, porém só foi possível obter conjugados com rendimentos inferiores a 4 % (Fig. 25).

Figura 25: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-ADH e a PspA1 empregando-se o EDAC como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circulada por linhas pontilhadas.

4.3.3 Conjugação intermediada pelo DMT-MM

Um novo protocolo foi desenvolvido com a substituição do agente ativador EDAC. O reagente cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM) pareceu-nos uma excelente alternativa ao EDAC devido à sua reduzida suscetibilidade à hidrólise. Seu uso tem sido proposto para a formação de carboxamidas em reações com moléculas orgânicas pequenas (KUNISHIMA et al., 2001) ou para ativação de grupos carboxilatos presentes em polissacarídeos com o objetivo de conjugá-los com moléculas orgânicas (SCHLOTTMANN et al., 2006; FARKAS e BYSTRICKY, 2007). Entretanto, o emprego deste reagente para a síntese de vacinas conjugadas não foi relatado anteriormente na literatura e resolvemos avaliar sua eficiência para esse propósito.

A figura 26 mostra a participação do DMT-MM como agente ativador numa reação de conjugação entre o grupo carboxilato da proteína e o grupo NH_2 presente no PS, originário da reação de derivatização.

R = PspA

Figura 26: Ativação da proteína pelo DMT-MM. O grupo carboxilato da proteína (A) ataca o carbono eletrofílico do anel triazínico do DMT-MM (B) gerando um intermediário reativo (A-B) que reage com o PS derivatizado com diamina ou hidrazida (C), gerando o conjugado (A-C).

A tabela 4 apresenta as diferentes condições reacionais, empregando o reagente DMT-MM como reagente ativador, e seus respectivos rendimentos.

De forma geral, observa-se uma melhora significativa no rendimento reacional das reações em que houve emprego do agente ativador DMT-MM quando comparado ao reagente EDAC. De acordo com os resultados expostos na tabela, também se verifica a eficiência do tampão fosfato em comparação à água, bem como o uso de concentrações altas de PS6B e PspA para a obtenção de rendimentos mais expressivos.

Tabela 4 - Condições reacionais adotadas e respectivos rendimentos para a síntese de conjugados intermediada pelo agente ativador DMT-MM.

Ensaio	PS6B	Proteína	[PS] _{final} mg/mL	[PspA] _{fin} mg/mL	V _{final} reação	DMT-MM	Tampão	Tempo	Rend.
I	PS-ADH	PspA1	5,3	5	3 mL	0,2 M	H ₂ O pH=6,5	24 h	5 %
II	PS-ADH	PspA3	7,5	15	2 mL	0,1 M	Fosf. 40 mM pH=7,5	24 h	52%
III	PS-ADH	PspA1	10	10	2 mL	0,1 M	Fosf. 40 mM pH=7,5	48 h	49%
IV	PS-ADH	PspA3	2,8	2,8	5,4 mL	0,1 M	Fosf. 40 mM pH=7,5	48 h	15%
V*	PS-OCT	PspA3	5,8	11	2,6 mL	0,1 M	Fosf. 40 mM pH=7,5	24 h	0 %
VI*	PS-OCT	PspA3	2,5	2,5	4 mL	0,1 M	Borato 50 mM pH=8,5	48 h	0 %
VII	PS-OCT	PspA1	3,3	4,6	2,2 mL	0,1 M	Borato 50 mM pH=8,5	48 h	0 %
VIII	PS-OCT	PspA3	7,5	8,0	2,5 mL	0,1 M	Fosf. 40 mM pH=8,5	20 h	15%
IX	PS-ADH	PspA3- modif.	6,5	7,3	2,2 mL	0,1 M	Fosf. 10 mM pH=7,5	48 h	65%
X	PS-OCT	PspA3- modif.	6,4	5,0	4 mL	0,1 M	Fosf. 10 mM pH=7,5	48 h	56%
XI	PS-OCT	PspA1- modif.	8,6	8,6	3,5 mL	0,1 M	Fosf. 10 mM pH=7,5	48 h	35%

Os ensaios assinalados com * apresentaram intensa formação de precipitado durante a reação. O rendimento das conjugações foi calculado com base na quantidade total de PS6B contida na fração do conjugado em relação à quantidade total de PS6B recuperada da cromatografia.

Conjugado PS6B-ADH-PspA1

O conjugado formado pelo PS6B-ADH e a proteína PspA1 (Ensaio III da Tabela 4) foi purificado por cromatografia hidrofóbica e seu perfil de eluição está apresentado abaixo (Fig. 27).

Figura 27: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-ADH e a PspA1 empregando o DMT-MM como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circulada por linhas pontilhadas.

Como se pode observar, o perfil de eluição foi diferente dos obtidos para os conjugados sem espaçador. Neste caso, o conjugado eluiu após o término do gradiente com sulfato de amônio, indicando um caráter mais hidrofóbico do produto. Não houve detecção de proteína livre no cromatograma acima, uma pequena quantidade foi detectada após lavagem da coluna com etanol 70%, sugerindo que uma porcentagem da PspA ligou-se fortemente à resina. O rendimento, conforme exposto na tabela 2 foi de 48,5% e a relação molar do PS6B em relação a PspA foi de 1:0,5 (considerando MM do PS6B como sendo 20 KDa e da PspA1 de 40 KDa), o que equivale a 1:1 em massa, idêntica à obtida pela conjugação dos mesmos compostos por aminação reductiva.

De forma geral, uma das grandes dificuldades encontradas durante as reações de conjugação foi a precipitação irreversível da mistura reacional. Quando era possível recuperar parte do sobrenadante, verificava-se elevada perda de PS e principalmente proteína. Como pode ser observada na tabela 4, essa precipitação foi mais evidente nos ensaios envolvendo o PS6B acoplado ao 1,8 diaminoctano (PS6B-OCT).

Um dos fatos que pode ser atribuído a essa precipitação é que a proteína, na presença de ativadores (EDAC e principalmente DMT-MM), é capaz de sofrer

reações inter e intramoleculares. A lisina, um dos mais comuns grupos reativos de proteínas, presente na PspA3 e na PspA1 numa porcentagem de aproximadamente 16%, atuam como bons nucleófilos em pH próximo a 8, formando ligações estáveis com carboxilatos presentes em aminoácidos como ácido aspártico e ácido glutâmico. Na presença de agentes ativadores essas ligações intra e intermoleculares são favorecidas e podem acarretar consequente precipitação.

Uma alternativa para reverter esse problema poderia ser a proteção das lisinas. Entre os reagentes empregados para essa proteção está o formaldeído. A reação do grupo amina da lisina com o formaldeído forma uma base de Schiff, a qual é reduzida pela adição de cianoboroidreto de sódio (Aminação Redutiva).

A reação da PspA1 e da PspA3 com o formaldeído na presença de cianoboroidreto de sódio mostrou redução de quase 100% das aminas presentes na proteína. Ensaios imunológicos mostraram que essa modificação na estrutura protéica não comprometeu a indução de anticorpos IgG e nem a funcionalidade desses anticorpos, resultando em porcentagens de deposição de complemento semelhantes às induzidas por anticorpos IgG anti-PspA nativa (Fig. 28).

Figura 28: Deposição de complemento sobre cepas de *S. pneumoniae* expressando PspA3. Cepas: A= P30; B= 539; C= P122. Linha sólida: Soro de animais imunizados com PspA3 nativa; Linha Tracejada: Soro de animais imunizados com PspA3 modificada.

A utilização dessas proteínas modificadas permitiu que as reações de conjugação ocorressem sem a formação de precipitados. As figuras 29, 30 e 31 mostram o perfil cromatográfico de alguns dos conjugados obtidos empregando a PspA modificada (Ensaio IX, X e XI da Tabela 4).

Conjugado PS6B-ADH-PspA3mod.

Figura 29: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-ADH e a PspA3mod empregando o DMT-MM como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circutada por linhas pontilhadas.

A relação entre a quantidade de PS contida nos conjugados e a quantidade de PS livre mostrou um rendimento de 65% e a relação molar entre o PS6B e a PspA3 foi 1:0.8 ou 1:1.6 em massa (considerando MM do PS6B como sendo 20 KDa e da PspA1 de 40 KDa).

Conjugado PS6B-OCT-PspA1mod.

Figura 30: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-OCT e a PspA1mod empregando o DMT-MM como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circundada por linhas pontilhadas.

O rendimento desse processo de conjugação ficou em torno de 35% e a relação entre PS e proteína foi 1:1 em mols ou 1:2 em massa.

Conjugado PS6B-OCT-PspA3mod.

Figura 31: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-OCT e a PspA3mod empregando o DMT-MM como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. A fração conjugada está circutada por linhas pontilhadas.

Conforme exposto na tabela 4 o rendimento para essa reação de conjugação (Fig. 31) foi de 55,4%. A relação molar de PS: Proteína foi de 1:1, o que equivale a uma relação em massa de 1:2.

Além dos ensaios apresentados na tabela 4, efetuou-se a síntese de um conjugado empregando o Toxóide Tetânico (T.T) e o PS6B-ADH. Como o T.T. é largamente empregado como carreador protéico, este conjugado foi produzido para atuar como um controle positivo dos ensaios efetuados. As condições de síntese foram semelhantes às empregadas para os conjugados com espaçadores: o T.T. (10 mg/mL) foi ativado com 0,1 M DMT-MM (Aldrich) e incubado com PS6B-ADH (6,5 mg/mL) em tampão fosfato de sódio 10 mM (pH=7,5) sob agitação por 24h.

No cromatograma de sua purificação (Fig. 32), nota-se que houve formação de dois conjugados diferentes, um com eluição durante o gradiente e outro após o seu término. Os ensaios imunológicos foram efetuados com o conjugado que eluiu no gradiente, o qual representou 17% dos 32% de rendimento total.

Figura 32: Cromatograma da reação de conjugação entre o PS-ADH e o T.T empregando o DMT-MM como agente ativador. Coluna Phenyl Sepharose. Eluição em gradiente decrescente de sulfato de amônio de 1,0 – 0,0 M (linhas tracejadas do gráfico). Abs_{490nm} e Abs_{280nm} correspondem respectivamente à leitura de PS e proteína. As frações conjugadas estão circundadas por linhas pontilhadas.

4.4 Análise dos Conjugados

O fato da proteína e do PS terem seus perfis de eluição alterados após reação de conjugação, passando a adotar uma característica de hidrofobicidade intermediária, é sugestivo de que os componentes estejam acoplados de forma covalente. Entretanto para confirmar a ocorrência dessa ligação entre o PS6B e a PspA foi realizada análise de alguns dos conjugados obtidos por eletroforese, empregando-se diferentes corantes para a identificação do PS (Coloração de Schiff) e da proteína (Coomassie Blue) (JUNG et al., 2006). A figura 32 mostra o perfil eletroforético das amostras.

Nota-se através dos géis (Fig. 33) que os conjugados apresentam um perfil arrastado (característico de amostras conjugadas) e mais concentrados no início do gel (devido à elevada massa molecular). A coloração efetuada com Schiff possui uma banda um pouco deslocada em relação à efetuada com Coomassie Blue, essa diferença pode ser atribuída ao fato de que foi empregado o dobro de massa na

eletroforese para detecção do PS, o que pode ter ocasionado certo deslocamento nessas bandas. As colorações empregadas mostraram-se específicas dado que a proteína nativa (poço 2) não corou com o reagente de Schiff e que o PS6B nativo com em torno de 1000 KDa (poço 3) também não foi corado por Coomassie Blue.

Figura 33: Perfil eletroforético dos conjugados. Gel de Poliacrilamida 10%. 1- Padrão de alto P.M. para proteína; 2- PspA3; 3- PS6B; 4- Conj. PS6B ADH - PspA3; 5- Conj. PS6B oxid PspA3; 6- Conj. PS6B OCT -PspA3; A) *Coomassie Blue*; B) Coloração de Schiff.

Para avaliar se a reação de conjugação não comprometeu epítomos importantes dos imunógenos, um ensaio descrito na literatura é a imobilização dos conjugados e análise da ligação de anticorpos específicos para os antígenos por meio de ELISA (PARAMESWAR et al., 2009). Como controles são utilizados os antígenos em seu estado nativo. A figura 34 mostra a aplicação dessa técnica na análise dos conjugados produzidos com a PspA3 como proteína carreadora.

Figura 34: Exposição de epítomos nos conjugados. Em azul incubação com anticorpos IgG anti-PS6B e em roxo anti-PspA3.

Através do gráfico acima se observa que os antígenos em seu estado nativo, conforme era esperado, só foram capazes de reagir com seus anticorpos específicos (*mouse* IgG anti-PspA e *goat* IgG anti-PS6B), enquanto os conjugados interagiram de forma eficiente com os dois anticorpos (anti-PspA e anti-PS6B), confirmando assim a coexistência de ambos os antígenos e a integridade dos epítomos após processo de conjugação.

4.5 Avaliação da Resposta Imunológica

A tabela 5 apresenta a composição dos conjugados utilizados em cada um dos experimentos para avaliação da resposta imunológica.

Tabela 5 - Composição dos conjugados empregados em imunizações

Experimento	Conjugado	Relação Molar PS:Proteína	Relação em massa PS:Proteína
I	PS6B oxid. – PspA3mod	1.0 : 2.2	1.0 : 4.4
	PS6B ADH – PspA3mod	1.0 : 0.7	1.0 : 1.4
	PS6B OCT – PspA3mod	1.0 : 1.9	1.0 : 3.8
II	PS6B oxid. – PspA1	1.0 : 0.5	1.0 : 1.0
	PS6B ADH – PspA1	1.0 : 0.5	1.0 : 1.0
III	PS6B oxid. – PspA3mod	1.0 : 2.2	1.0 : 4.4
	PS6B ADH – PspA3mod	1.0 : 0.8	1.0 : 1.6
	PS6B OCT – PspA3mod	1.0 : 1.0	1.0 : 2.0
IV	PS6B ADH – PspA3mod	1.0 : 0.8	1.0 : 1.6
V	PS6B oxid. – PspA3mod	1.0 : 0.9	1.0 : 1.8
	PS6B ADH – PspA3mod	1.0 : 0.4	1.0 : 0.8
	PS6B OCT – PspA3mod	1.0 : 0.3	1.0 : 0.6
	PS6B ADH – T.T.	1.0 : 0.8	1.0 : 1.6
VI	PS6B oxid. – PspA1mod	1.0 : 3.2	1.0 : 6.4
	PS6B ADH – PspA1mod	1.0 : 0.7	1.0 : 1.4
	PS6B OCT – PspA1mod	1.0 : 2.0	1.0 : 4.0

4.5.1 Avaliação de resposta imune induzida contra PS6B

O PS capsular é considerado o principal fator de virulência do pneumococo, sendo capaz de proteger a bactéria contra a fagocitose (HAUSDORFF; SIBER; PARADISO, 2009; HYAMS et al., 2010; VARVIO et al., 2009). Pela sua habilidade em encobrir os antígenos subcapsulares, a cápsula inibe tanto a ligação de anticorpos como a deposição de complemento na superfície da bactéria, dificultando o *clearance* via fagócitos (HYAMS et al., 2010; MARTNER et al., 2009).

A avaliação da resposta imune anti-PS6B iniciou-se pela determinação dos anticorpos induzidos dado que a antigenicidade dos PS capsulares e proteção conferida por anticorpos desenvolvidos contra a cápsula são reconhecidas desde a primeira metade do século XX (MACLEOD et al., 1945; AUSTRIAN, 1999; WATSON e MUSHER, 1999).

Nos experimentos I e II (empregando PspA3 e PspA1 respectivamente como proteínas carreadoras) a massa de PS conjugado por dose foi estabelecida como de 5 µg, semelhante à dose comumente empregada em humanos. A figura 35 mostra o nível de anticorpos IgG anti-PS6B para esses dois experimentos.

Figura 35: Título de anticorpos IgG anti-PS6B. Dose empregada nas imunizações: 5 µg de PS6B livre ou conjugado. **A)** Conjugados empregando PspA3. **B)** Conjugados empregando PspA1. Vacina comercial Prevenar® foi utilizada como controle dos ensaios (1/5 da dose humana/dose). Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey).

Apesar do nível de anticorpos induzido pelos conjugados mostrarem ser significativamente diferentes dos induzidos pelos grupos Salina e Prevenar® nota-se que esses títulos são muito baixos e, com exceção do conjugado PS6B ADH – PspA3, nenhum deles foi significativamente superior aos grupos co-administrados.

Como no experimento I a massa de PspA por dose foi variável entre os grupos (devido a aleatoriedade das relações entre a massa de PS6B e de PspA no conjugado - tabela 5), desenhou-se outro experimento no qual a dose de PspA foi estabelecida como padrão (5 µg/dose), variando-se assim a massa de PS6B por grupo. Neste caso coube ao PS uma dose ainda inferior a empregada nos experimentos anteriores, ocasionando assim a não indução de resposta imune (não houve diferença do título de anticorpos induzidos pelo conjugado e pelo grupo salina – resultados não mostrados).

A baixa resposta imunológica induzida contra o PS6B não pode ser atribuída à ineficiência da conjugação, uma vez que a vacina comercial Prevenar® foi empregada como controle e também não induziu resposta imune (títulos foram inferiores aos observados para o grupo salina). Ao compararmos os experimentos I, II e III, notamos que ao reduzir a dose de PS6B conjugado, a indução de anticorpos

também é reduzida sugerindo uma resposta dose dependente para o PS6B. Para verificar se a resposta imune para o 6B é dose dependente, foi efetuado um novo experimento em que se empregou apenas um conjugado (PS6B ADH – PspA3mod) em duas doses diferentes (4 µg de PS conjugado e 40 µg de PS conjugado). A figura 36 mostra dependência da dose de PS6B conjugado na indução de resposta imune.

Figura 36: Concentração de anticorpos IgG anti-PS6B. Dose empregada nas imunizações: 40 µg de PS6B coadministrado, 4 µg de PS6B conjugado (1X) ou 40 µg de PS6B conjugado (10X). Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey).

Diante da hipótese de uma resposta imune dependente da dose, foram realizados novos ensaios empregando os 3 tipos de conjugados na dose de 30 µg de PS6B. Como o emprego da vacina Prevenar® como controle teria um custo muito elevado (seria necessário mais de 100 doses da vacina comercial) foi produzido um conjugado entre o PS6B ADH e o Toxóide Tetânico, proteína esta comumente empregada como carreadora, para ser utilizado como controle. A figura 37A mostra os resultados desse experimento. Paralelamente efetuou-se um experimento para verificar a resposta imune induzida pelos conjugados utilizando a PspA1 como carreadora em que foi aplicado uma dose equivalente a 15 µg de PS6B (Fig. 37B).

Figura 37: Título de anticorpos IgG anti-PS6B. **A)** Conjugados PS6B-PspA3; **B)** Conjugados PS6B-PspA1. Dose empregada nas imunizações: A) 30 µg de PS6B livre ou conjugado à PspA3 ou ao T.T. B) 15 µg de PS6B livre ou conjugado à PspA1. Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey).

Contrariando nossas expectativas, nos experimentos empregando doses maiores de PS6B (Fig. 37) não se observou indução de anticorpos anti-PS6B e um título modesto foi observado para o conjugado empregando Toxóide Tetânico. Entretanto, um ponto que merece destaque é o elevado título observado para o grupo salina o que pode estar mascarando a detecção dos anticorpos anti-PS6B.

Várias alterações no ensaio de ELISA foram efetuadas, tais como: **1) alterações no coating** – uso de diferentes tampões (PBS, Tampão Carbonato-Bicarbonato), titulações para determinação da concentração ótima do antígeno, diferentes tempos de incubação e temperaturas, emprego de albumina metilada para aumentar a aderência do PS à placa; **2) alterações no bloqueio** – uso de diferentes concentrações de Molico®, BSA; **3) alterações na incubação com o soro dos animais imunizados** – soro diluído em BSA ou Molico® 1-10%, na presença e ausência de Tween 20; entre outros. Contudo, nenhum dos procedimentos adotados foi capaz de solucionar esse problema.

Esse fato dá margem a várias hipóteses como: a baixa responsividade do modelo animal, a baixa imunogenicidade do PS6B, o emprego de uma dose

inadequada ou a ineficiente apresentação do PS, seja devido a uma grande alteração em sua estrutura, ou seja, pela relação PS:Proteína não ter sido adequada.

Essas hipóteses encontram suporte na literatura, de acordo com a qual o tipo de conjugação, a composição antigênica do conjugado (PS e proteína), a relação de proteína e de PS, a dose empregada e a exposição prévia ao antígeno são determinantes para o efeito de *boosting* contra o PS (WESSELS et al., 1990; MCCOOL et al., 1999; KHAN; LEES; FRASCH, 2004).

Outro fato relacionado a imunogenicidade do PS é seu tamanho. PS de baixo peso molecular são em geral pouco imunogênicos. Entretanto, em nosso caso o tamanho não pode ser considerado como fator para a não indução de anticorpos anti-PS6B, pois além do ensaio utilizando o conjugado como *coating* não apontar para o comprometimento dos epítomos do antígeno, trabalhos recentes tem demonstrado que polissacarídeos sintéticos de até 3 unidades monoméricas foram capazes de induzir uma resposta imune protetora (JANSEN et al., 2001). Ensaio realizados em coelhos mostraram que oligossacarídeos sintéticos do sorotipo 6B (com 3 ou 4 subunidades) quando conjugados à proteína KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*) foram capazes de eliciar boa resposta, exibindo inclusive resposta cruzada contra o PS6A. Contudo é importante ressaltar que este trabalho, assim como outros descritos na literatura, não apresenta os resultados para o grupo salina e co-administrado, dificultando estabelecer afirmações sobre a eficiência da conjugação. De forma interessante no estudo efetuado por Jansen et al. (2001) o conjugado utilizando o PS6B “natural” conjugado induziu menos anticorpos anti-PS6B do que o PS6B sintético conjugado.

Com o intuito de avaliarmos se a baixa detecção de anticorpos anti-PS6B estava relacionada à baixa habilidade do sistema imune em induzir respostas contra esse polissacarídeo, efetuamos uma análise comparativa entre a indução de IgG sérico anti-PS6B e anti-PS14 induzida pela imunização com a vacina comercial Prevenar®. Através dos resultados apresentados na figura 38, nota-se que o PS6B realmente apresenta uma baixa imunogenicidade quando comparado, por exemplo, com o sorotipo 14 de *S. pneumoniae*.

Figura 38: Detecção de IgG sérico anti-PS6B e anti-PS14 no soro de camundongos imunizados com a Prevenar® (1/5 da dose humana/dose).

A baixa imunogenicidade do PS6 ainda é motivo de investigação (FAIRCHILD e BRALEY-MULLEN, 1983). Várias são as dificuldades relacionadas não só ao sorotipo 6B como ao sorogrupo 6 como um todo, cuja resposta possui uma maturação mais lenta do que os demais sorotipos (FAIRCHILD e BRALEY-MULLEN, 1983). Ao se observar as respostas induzidas pelo PS6B foram verificados títulos muito baixos, onde a diferença entre o PS livre e o PS conjugado não ultrapassa a ordem de $1,5 \log_{10}$ (JANSEN et al., 2001). Segundo Chu et al. (2000), o emprego de $10 \mu\text{g}$ de conjugado PS6B-CRM₁₉₇ (equivalente a mais de 2 doses humanas da vacina comercial) por camundongo por imunização mostrou que na ausência do adjuvante CpG a resposta induzida pelo conjugado não ultrapassou o título de 10. O fato de que a maioria dos trabalhos não efetua comparação dos conjugados com seus componentes co-administrados, dificulta qualquer afirmação sobre a eficiência da nossa conjugação.

A baixa imunogenicidade do PS6B em relação aos demais sorotipos é um dos fatores que faz com que esse PS seja empregado no dobro da dose utilizada para os demais sorotipos em vacinas comerciais (VESIKARI et al., 2009; DUGGAN, 2010). Estudo efetuado em camundongos empregando conjugados com PS14, PS4 e PS6B mostraram que o PS6B, ao contrário dos demais PSs, não foi capaz de eliciar resposta diferente do controle negativo (salina) (MORENO et al., 2004). Outros

trabalhos também destacam o PS6B, juntamente com o PS23F, como os PSs de *S. pneumoniae* com menor resposta imune (LUCAS et al., 1997; VESIKARI et al., 2009; DUGGAN, 2010). Apesar do PS6B apresentar uma baixa indução de anticorpos, esses anticorpos mostram-se protetores em ensaios de OPA (EKSTROM et al., 2007; VESIKARI et al., 2009). Concentrações de anticorpos anti-PS6B entre 0.01-0.1 µg/mL foram capazes de oferecer proteção no ensaio de OPA, sendo o 6B considerado um sorotipo susceptível à deposição de complemento e à opsonofagocitose (MELIN et al., 2009; MELIN et al., 2010).

Os primeiros ensaios envolvendo a análise de deposição de complemento mediada por anticorpos anti-PS6B não foram conclusivos (resultados não mostrados), principalmente devido a elevada deposição observada para cepas sorotipo 6B mesmo na ausência de anticorpos. A presença de um alto conteúdo de grupos hidroxilas livres no PS6B tem sido associado com seu elevado nível de deposição de C3. O C3 pode se ligar a esses grupamentos hidroxilas através de ligações do tipo éster (MELIN et al., 2009).

Diante das dificuldades enfrentadas com relação à avaliação da resposta imunológica induzida contra o PS6B demos continuidade ao projeto avaliando a resposta imune induzida contra a PspA.

4.5.2 Avaliação da Resposta Imune induzida contra a PspA

A PspA por ser uma proteína altamente conservada entre os diversos sorotipos de *S. pneumoniae* e por apresentar elevada imunogenicidade (TALKINGTON et al., 1991; MCDANIEL et al., 1994; BRILES et al., 1996; HAMMERSCHMIDT et al., 1999; TU et al., 1999; BRILES et al., 2000a; BRILES et al., 2000b; MIYAJI et al., 2002; ABEYTA; HARDY; YOTHER, 2003; BRILES et al., 2003; MIYAJI et al., 2003; BOGAERT et al., 2004; BARIL et al., 2006; DANIELS et al., 2006; HOLLINGSHEAD et al., 2006; SEM; CHEN; SNAPPER, 2006; LI et al., 2007; OCHS et al., 2008) foi escolhida como proteína carreadora para constituir uma vacina conjugada juntamente com o PS6B, sorotipo de grande importância epidemiológica não só no Brasil como mundialmente (HAUSDORFF; SIBER; PARADISO, 2009; BRANDILEONE et al., 1995; BRANDILEONE et al., 2003;

DUGGAN, 2010). O propósito dessa vacina é aumentar a cobertura vacinal entre diferentes sorotipos, através da resposta induzida contra a PspA. Entretanto, conforme descrito na literatura, a indução de anticorpos contra a proteína carreadora pode ser afetada pelo tipo de PS conjugado a ela (MCCOOL et al., 1999; KAMBOJ et al., 2003; LEONARD et al., 2003). Como no presente caso temos interesse na resposta imune desencadeada contra a PspA, é de fundamental importância que o processo de conjugação não comprometa a sua imunogenicidade. Segundo Leonard et al. (2003) o tipo de PS pode influir sobre o processamento do CRM₁₉₇ e, de acordo com os resultados apresentados por eles, os conjugados envolvendo PS sorotipo 19F e 6B ocasionaram maior comprometimento da resposta imune desencadeada contra a proteína carreadora, ao contrário do observado para os sorotipos 14 e 18F. Isso pode ocorrer, por exemplo, se a localização do carboidrato ocorrer na região de ligação do carreador ao MHCII, abolindo o reconhecimento por células T e/ou alterando o determinante antigênico, ou, dependendo do PS, se houver modificação do perfil de proteólise endossomal da proteína. Diferentes epítomos para o CRM₁₉₇ foram observados para os conjugados 6B-CRM₁₉₇, 19F-CRM₁₉₇ e 23F-CRM₁₉₇ (MCCOOL et al., 1999; LEONARD et al., 2003).

Como anticorpos IgG anti-PspA constituem um importante mecanismo contra infecções pneumocócicas sendo capaz de oferecer proteção contra ensaios de desafio (MCDANIEL et al., 1991; TALKINGTON et al., 1991; BRILES et al., 1996), iniciamos a análise da resposta imune anti-PspA através da avaliação da indução de anticorpos IgG. A figura 39 mostra o título de anticorpos anti-PspA1 para o experimento II (utilizando 5 µg de PspA por dose).

Figura 39: Título de anticorpos IgG anti-PspA1. Dose empregada nas imunizações: 5 µg de PspA1 livre ou conjugada. Vacina comercial Prevenar® (0 µg de PspA3). Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey).

Através da figura 39 pode-se notar que a conjugação sem espaçador (PS6B oxid.- PspA1), induziu mesmo nível de anticorpos anti-PspA1 do que o grupo co-administrado. Já a conjugação utilizando ADH como molécula espaçadora induziu títulos de anticorpos um pouco menores. Esse mesmo perfil foi observado para o ensaio utilizando a PspA3 como proteína carreadora (exp. III), no qual o grupo imunizado com o conjugado empregando ADH apresentou um título de anticorpos inferior aos demais grupos (Fig. 40A).

Além da determinação de anticorpos IgG sérico, outro parâmetro a ser analisado é a subclasse desses anticorpos. A resposta induzida por antígenos protéicos em camundongos ocorre com predomínio de IgG1 (BRILES et al., 1981; ALONSODEVELASCO et al., 1995). Entretanto, estudos recentes sugerem que a proteção conferida contra infecções pneumocócicas está relacionada com a indução balanceada entre os isotipos IgG1 e IgG2a (FUKUYAMA et al., 2010; FERREIRA et al., 2008).

A análise do perfil desses isotipos para as imunizações empregando a PspA3 como proteína carreadora (exp. III) mostrou um título ligeiramente superior de

IgG1 em relação ao IgG2a (Fig. 40B), sendo que a relação entre esses isotipos se manteve praticamente constante entre os diferentes grupos, sugerindo que a conjugação não afetou o perfil de isotipos induzidos contra a PspA3.

A fagocitose eficiente do pneumococo é dependente tanto da indução de anticorpos específicos como do sistema complemento (GORDON et al., 2000). A capacidade da PspA em inibir a deposição de complemento é considerada a principal responsável por seu destaque como fator de virulência. Entre as diversas funções desempenhadas pelo sistema complemento (RICKLIN et al., 2010) destaca-se a indução de fagocitose de microorganismos, a inflamação e a lise celular. Assim, além da determinação dos níveis de anticorpos IgG e seus isotipos, a análise de deposição de complemento constitui ensaio importante na elucidação da resposta imune anti-PspA induzida. Com o intuito de verificar, por exemplo, se a redução no título de anticorpos observado para o conjugado com ADH (Fig. 40A) poderia comprometer seu efeito protetor, foi analisada a deposição de complemento induzida por esses anticorpos sobre uma bactéria PspA clado 3, sorotipo não 6B (Fig. 40C-D).

Conforme exposto, os conjugados empregando moléculas espaçadoras não apresentaram deposição de complemento. Mesmo o conjugado empregando OCT, o qual havia induzido mesmo título de anticorpos anti-PspA do que o grupo co-administrado, não foi capaz de induzir deposição de complemento, sugerindo que a conjugação com moléculas espaçadoras comprometeria a resposta contra a proteína carreadora.

Figura 40: **A)** Título de anticorpos IgG anti-PspA3. **B)** Relação entre IgG1 e IgG2a anti-PspA3. **C)** Ensaio de deposição de complemento - Cepa 275/97 (PspA clado 3, sorotipo 14). **D)** Índice de Fluorescência (IF) para o ensaio de deposição de complemento. Dose empregada nas imunizações: 5 µg de PspA3 livre ou conjugada. Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey).

Grupo	FITC + (%)	Mediana
Salina	31.20	6.10
Prevenar®	43.59	8.07
Conj. PS6B oxid - PspA3	84.01	166.64
Conj. PS6B OCT - PspA3mod	48.86	9.34
Conj. PS6B ADH - PspA3mod	48.06	9.23
PS6B + PspA3mod Coad.	86.82	247.94
PS6B + PspA3 Coad.	84.75	259.07

Todavia, ao analisarmos a indução de anticorpos anti-PspA no soro dos animais imunizados com doses diferentes de conjugado empregando PS6B-ADH (1X e 10X), pudemos observar que apesar da menor indução de anticorpos IgG anti-PspA para os grupos imunizados com a proteína conjugada (Fig. 40A), houve maior deposição de complemento para o grupo imunizado com o conjugado na dose mais elevada (10X maior) quando comparado com o grupo imunizado com a PspA nativa (Fig. 40C). A relação entre os isotipos IgG1 e IgG2a (Fig. 40B) foi próxima para os 3 grupos. Interessantemente a eficiência na deposição de complemento para os conjugados parece estar relacionada com a dose empregada, dado que o conjugado em sua dose menor não foi capaz de elucidar a mesma deposição observada para o conjugado com dose 10X maior.

Figura 41: **A)** Título de anticorpos IgG anti-PspA3. **B)** Relação entre IgG1 e IgG2a anti-PspA3. **C)** Ensaio de deposição de complemento - Cepa 275/97 (PspA clado 3, sorotipo 14). **D)** Índice de Fluorescência (IF) para o ensaio de deposição de complemento. Dose empregada nas imunizações: 60 µg de PspA3 livre, 6 µg ou 60 µg de PspA3 conjugada (1X e 10X respectivamente). Soro obtido na 3ª Sangria. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey).

A

B

C

D

Grupo	FITC + (%)	Mediana
Conj. PS6B ADH – PspA3 10 X	98.95	632.86
Conj. PS6B ADH – PspA3 1 X	44.95	8.20
PS6B + PspA3 Coad.	96.99	361.12
Salina	48.86	9.27

Diante da suspeita de uma resposta dose dependente, o experimento efetuado com conjugados empregando a PspA3 como carreador foi repetido empregando os 3 tipos de conjugados, porém numa dose maior (experimento V). A análise do título de anticorpos IgG sérico anti-PspA3, IgG1 e IgG2a induzidos e a deposição de complemento para esse experimento está apresentado na figura 42.

Novamente, apesar do menor título de anticorpos IgG anti-PspA3 induzidos pelos conjugados PS6B ADH – PspA3 e PS6B OCT –PspA3, a deposição de complemento mediada por esses anticorpos não foi comprometida, sendo observada uma resposta igual ou superior ao grupos contendo PS6B e PspA3 co-administrados. Desta forma, pode-se dizer que há uma dose ótima de conjugado capaz de induzir uma resposta superior à induzida pelos compostos na mesma dose, porém co-administrados.

Figura 42: **A)** Título de anticorpos IgG anti-PspA3. **B)** Relação entre IgG1 e IgG2a anti-PspA3. **C)** Ensaio de deposição de complemento - Cepa 275/97 (PspA clado 3, sorotipo 14). **D)** Índice de Fluorescência (IF) para o ensaio de deposição de complemento. Dose empregada nas imunizações: 56 µg de PspA3 nativa coadministrada com PS6B, 20 µg de PspA3mod coadministrada com PS6B, 56 µg de PspA3 conjugado ao PS6B oxid, 20 µg de PspA3 conjugada ao PS6B ADH, 18 µg de PspA3 conjugado ao PS6B OCT. Soro obtido na 3^a Sangria. *diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey).

Grupo	FITC + (%)	Mediana
Salina	44.74	8.21
Conj. PS6B ADH - T.T.	35.18	6.86
Conj. PS6B oxid - PspA3	85.68	254.22
Conj. PS6B OCT - PspA3mod	96.75	661.79
Conj. PS6B ADH - PspA3mod	99.32	522.75
PS6B + PspA3mod Coad.	97.61	482.16
PS6B + PspA3 Coad.	93.19	370.13

Conforme mencionado, mais importante do que determinar a concentração de anticorpos é determinar sua funcionalidade. Além do ensaio de deposição de complemento, outro ensaio com destaque na elucidação da resposta imune e na funcionalidade dos anticorpos é a opsonofagocitose (OPA). Por ser considerado o mecanismo primário de defesa do organismo contra a doença pneumocócica (TUOMANEN et al., 1995; POOLMAN, 2004), o OPA é um ensaio com grande correlato de proteção (HENCKAERTS et al., 2007; SCHUERMAN et al., 2007) sendo inclusive recomendado como ensaio de proteção/eficácia vacinal pela WHO (EKSTROM et al., 2007). A proteção conferida pelas vacinas comerciais deve-se ao efeito opsonofagocítico dos anticorpos (PARK et al., 2008), sendo a opsonofagocitose dependente de complemento essencial para eliminação pneumococo da circulação (BROWN; HOSEA; FRANK, 1983).

Desta forma, decidimos finalizar a análise imunológica dos conjugados quanto à resposta anti-PspA através do ensaio de opsonofagocitose. Os resultados obtidos para o OPA foram congruentes aos obtidos para a deposição de complemento (Fig. 43), evidenciando que o processo de conjugação não comprometeu a imunogenicidade da PspA3.

Figura 43: Ensaio de Opsonofagocitose. Soros em teste, diluídos 1:16, foram incubados com a cepa P122 (PspA clado 3, sorotipo 10 A), seguido de 10% de fonte de complemento e células isoladas do peritônio. As bactérias foram plaqueadas em ágar sangue e o número de UFCs viáveis foi determinado após 20h. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: Fator Único, teste de Tukey).

O Experimento VI, envolvendo conjugados com PspA1 como proteína carreadora, também foi avaliado quanto à indução de resposta imune anti-PspA. De acordo com as figuras 44 e 45, os conjugados, com exceção ao PS6B ADH – PspA1mod (o qual foi empregado em uma dose baixa de PspA) mostram capacidade de induzir anticorpos capazes de depositar complemento e com atividade opsonofagocítica superior ao induzido pelos grupos imunizados com os componentes co-administrados.

Figura 44: **A)** Título de anticorpos IgG anti-PspA1. **B)** Relação entre IgG1 e IgG2a anti-PspA1. **C)** Ensaio de deposição de complemento - Cepa 245/00 (PspA clado 1, sorotipo 14) e Cepa P630 (PspA clado 1, sorotipo 14). Dose empregada nas imunizações: 45 µg de PspA3 nativa coadministrada com PS6B, 21 µg de PspA3mod coadministrada com PS6B, 48 µg de PspA3 conjugado ao PS6B oxid, 11 µg de PspA3 conjugada ao PS6B ADH, 30 µg de PspA3 conjugado ao PS6B OCT. Soro obtido na 3ª Sangria. *diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: fator único, teste de Tukey).

		Cepa 245/00		Cepa P630	
Grupo		FITC + (%)	Mediana	FITC + (%)	Mediana
Salina		32.61	5.19	42.34	4.59
Conj. PS6B oxid - PspA1		90.42	154.23	90.40	138.92
Conj. PS6B OCT - PspA1mod		87.78	125.51	87.57	98.45
Conj. PS6B ADH - PspA1mod		63.65	24.39	71.96	44.70
PS6B + PspA1mod Coad.		84.56	118.10	90.99	153.18
PS6B + PspA1 Coad.		90.30	147.55	89.44	120.30

Figura 45: A) Índice de Fluorescência (FI) para o ensaio de deposição de complemento. **B)** Ensaio de Opsonofagocitose. Soros em teste, diluídos 1:16, foram incubados com a cepa 245/00 (PspA clado 1, sorotipo 10 A), seguido de 10% de fonte de complemento e células isoladas do peritônio. As bactérias foram plaqueadas em ágar sangue e o número de UFCs viáveis determinado após 20h. * diferenças significativas $p < 0.05$ (ANOVA: Fator Único, teste de Tukey).

De forma geral, pudemos observar que a resposta imune induzida contra a PspA foi mantida após a conjugação e, em alguns casos, pode-se inclusive notar uma melhora na resposta induzida pelos conjugados. Essa melhora na resposta anti-PspA possivelmente está associada à influência do PS sobre o processamento endossomal da proteína, sendo o mecanismo exato ainda motivo de estudo.

Os resultados obtidos para a deposição de complemento foram bastantes sólidos dado que se observou a concordância desses com os resultados obtidos para o ensaio de opsonofagocitose. A medida do título de anticorpos séricos anti-PspA3 por sua vez mostrou-se como um parâmetro frágil para a afirmação de uma boa resposta imune, uma vez que a melhor atividade opsonofagocítica não foi observada para o grupo com maior título de anticorpos IgG sérico.

4.6 Determinação da Estrutura Secundária da PspA

Com o intuito de avaliar a influência da conjugação sobre a estrutura secundária da PspA3, os conjugados empregados no experimento V foram analisados por dicroísmo circular (CD) (CRANE; BOLGIANO; JONES, 1997; JEDRZEJAS; LAMANI; BECKER, 2001; KELLY; JESS; PRICE, 2005; KREISMAN et al., 2007).

A figura 46 mostra as curvas de elipticidade molar para os conjugados e para a PspA3 no seu estado nativo e modificado.

Figura 46: Análise da Estrutura Secundária da PspA3 por Dicroísmo Circular.

A deconvolução dos dados obtidos por dicroísmo circular (CD) utilizando o algoritmo CDSSTR (JOHNSON, 1999) nos forneceu uma descrição detalhada da estrutura protéica antes e depois da conjugação (Fig. 47).

Figura 47: Deconvolução dos dados obtidos por CD para a PspA3 livre (nativa ou modificada) ou para a PspA3 conjugada. Porcentagem de cada estrutura é apresentada sobre sua respectiva barra.

De acordo com os dados obtidos por CD a modificação da PspA3 com formaldeído não alterou significativamente a sua estrutura secundária. Já a reação de conjugação promoveu uma redução na quantidade de alfa hélices e um aumento da porcentagem de estrutura não ordenada. Dentre os conjugados produzidos, o conjugado empregando a molécula de ADH como espaçador foi a que mais conservou a estrutura da proteína.

Essa desestruturação da PspA3 ocasionada pela reação de conjugação não parece influir na resposta imune contra a proteína uma vez que o conjugado PS6B OCT – PspA3, cuja alteração na estrutura da PspA3 foi a mais pronunciada, foi capaz de induzir alta deposição de complemento e proteção no ensaio de opsonofagocitose. Essa independência da resposta imune com a estrutura da PspA pode ser associada ao fato de linfócitos T, em geral, reconhecerem epítomos lineares, não sendo capazes de distinguir entre antígenos nativos e desnaturados (ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Apesar da necessidade de ensaios que avaliem a resposta induzida contra o PS6B, os resultados obtidos nesse projeto são favoráveis ao emprego da nova

metodologia de conjugação (com uso dos espaçadores de 6 ou 8 átomos de carbono), uma vez que combina alto rendimento reacional e manutenção na resposta imune induzida contra a PspA. Esses resultados são apresentados de forma resumida na tabela 6.

Tabela 6 - Comparação dos conjugados quanto às vantagens como antígeno vacinal

Parâmetro	Conj. PS6B oxid – PspA	Conj. PS6B ADH – PspA	Conj. PS6B OCT – PspA
Rendimento obtido na conjugação	+	+++	++
Indução de IgG anti – PspA	+++	++	++
Deposição de Complemento	+++	+++	+++
Ensaio de Opsnofagocitose (OPA)	+++	++	+++
Manutenção da Estrutura secundária da PspA3	++	+++	+

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da tecnologia de conjugação já ser bem descrita e utilizada, o que se observa é que se trata de um processo de baixo rendimento, pelo qual, de forma geral, menos de 20% do PS ativado torna-se conjugado (FRASCH, 2009). A nova rota proposta nesse trabalho, envolvendo o emprego do agente ativador DMT-MM, tem atingido um rendimento superior a 50%, rendimento esse que pode ser ainda melhorado. Diante desses dados e de outros dados promissores envolvendo o uso do ativador DMT-MM obtidos pela Dra. Giovana Barazzone para a obtenção da vacina conjugada contra *Haemophilus influenza*, foi solicitada patente do processo para a INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) - Protocolo 020090110489 de 26/11/2009.

De forma resumida pode-se dizer que além da geração de um novo método de conjugação, acima citado, métodos analíticos bem como métodos para modificação do PS foram estabelecidos com sucesso, permitindo a produção de 6 conjugados diferentes a partir do PS6B de *S. pneumoniae* e da proteína PspA (clado 1 ou clado 3). Ensaio envolvendo o PS6B oxidado sugerem que a ligação da proteína ao PS ocorre no ribitol. Análise por gel bi-dimensional permitiram uma avaliação mais acurada da pureza das amostras de PspA3 e inspiraram a adoção de novos protocolos de purificação mais eficientes. A proteção das lisinas presentes na PspA não comprometeram epítomos importantes da proteína, podendo ser utilizada como procedimento para aumentar o rendimento e a especificidade da reação de conjugação.

Apesar do sucesso obtido na síntese dos conjugados, a análise imunológica ainda tem deixado questões em aberto.

Os conjugados, na maioria dos experimentos, foram capazes de manter a imunogenicidade da proteína, havendo inclusive uma melhora na resposta imune anti-PspA dependendo da estrutura do conjugado (principalmente PS6B OCT – PspA3mod) e da dose empregada (acima de 15 µg). A taxa de deposição de complemento foi congruente com os resultados obtidos para o ensaio de opsonofagocitose, ensaio este amplamente aceito como correlato de proteção

(TUOMANEN et al., 1995; POOLMAN, 2004; HENCKAERTS et al., 2007; SCHUERMAN et al., 2007; EKSTROM et al., 2007).

Contrariando nossa expectativa inicial, o estudo da resposta imune induzida pelos conjugados contra o PS6B, utilizando camundongos Balb/c como modelo animal, não foi conclusivo. Apesar da baixa imunogenicidade descrita para esse polissacarídeo (COWAN et al., 1978; KARMA et al., 1980; FAIRCHILDBRALEY-MULLEN, 1983; JANSEN et al., 2001), o fato de ser um sorotipo de grande importância epidemiológica no Brasil e de ter sido inserido com sucesso nas vacinas licenciadas, fez com que esse sorotipo ganhasse destaque e despertasse nosso interesse em incluí-lo no estudo de uma vacina conjugada multivalente (Projeto de Pesquisa FAPESP - Temático 2008/05207-4). Todavia, dada a grande dificuldade na detecção de títulos de anticorpos IgG contra o PS6B tanto nos grupos imunizados com os conjugados sintetizados por nós como no grupo imunizado com a vacina comercial Prevenar®, não se pôde elaborar nem afirmações positivas, nem afirmações negativas quanto ao potencial desses conjugados em induzir uma resposta imune anti-6B. A realização de ensaios de opsonofagocitose contra o PS e/ou a alteração do modelo animal serão realizados em estudos futuros na tentativa de se elucidar a resposta anti-PS6B.

Os dados obtidos para análises por CD mostram que a conjugação altera a estrutura secundária da PspA, principalmente no caso da conjugação com o espaçador de 8 carbonos, entretanto essa desestruturação não comprometeu a indução de uma resposta imune protetora.

Os resultados mostram que o método de conjugação empregado permite obter proteção para a proteína embora para a maximização deste efeito haja a necessidade de uma dose maior do que normalmente empregado para vacinas de PspA (MCDANIEL et al., 1998).

6 CONCLUSÃO

Esse estudo permitiu o desenvolvimento do protocolo de conjugação entre o PS6B e a PspA de dois clados, 1 e 3, além de propor uma nova estratégia de conjugação, cujo rendimento mostrou-se superior ao comumente descrito na literatura. A modificação dos resíduos de lisina não afetou a indução da resposta imune da PspA. As análises imunológicas mostraram que a PspA conservou sua imunogenicidade após as reações de conjugação, sendo passível de ser empregada como carreadora em vacinas futuras visando o aumento da cobertura vacinal.

REFERÊNCIAS³

ABBAS, A. K.; LICHTMAN A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. 564 p.

ABEYTA, M.; HARDY, G. G.; YOTHER, J. Genetic alteration of capsule type but not PspA type affects accessibility of surface-bound complement and surface antigens of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 1, p. 218-225, 2003.

ALONSODEVELASCO, E.; VERHEUL, A. F.; VERHOEF, J.; SNIPPE, H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 591-603, 1995.

AUSTRIAN, R. The pneumococcus at the millennium: not down, not out. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. S338-341, 1999. Suppl 2.

BARIL, L.; DIETEMANN, J.; ESSEVAZ-ROULET, M.; BENIGUEL, L.; COAN, P.; BRILES, D. E.; GUY, B.; COZON, G. Pneumococcal surface protein A (PspA) is effective at eliciting T cell-mediated responses during invasive pneumococcal disease in adults. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 145, n. 2, p. 277-286, 2006.

BAROCCHI, M. A.; CENSINI, S.; RAPPUOLI, R. Vaccines in the era of genomics: the pneumococcal challenge. **Vaccine**, v. 25, n. 16, p. 2963-2973, 2007.

BAUMGARTH, N. A two-phase model of B-cell activation. **Immunol. Rev.**, v. 176, p. 171-180, 2000.

BENSCHOP, R.J.; MELAMED, D.; NEMAZEE, D.; CAMBIER, J.C. Distinct signal thresholds for the unique antigen receptor-linked gene expression programs in mature and immature B cells. **J. Exp. Med.**, v. 190, p. 749-756, 1999.

BLACK, R. E.; MORRIS, S. S.; BRYCE, J. Where and why are 10 million children dying every year? **Lancet.**, v. 361, n. 9376, p. 2226-2234, 2003.

³ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOGAERT, D.; HERMANS, P. W.; ADRIAN, P. V.; RUMKE H. C.; DE GROOT R. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. **Vaccine**, v. 22, n. 17-18, p. 2209-2220, 2004.

BRANDILEONE, M. C.; ANDRADE, A. L.; TELES, E. M.; ZANELLA, R. C.; YARA, T. I.; DI FABIO, J. L.; HOLLINGSHEAD, S. K. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine**, v. 22, n. 29-30, p. 3890-3896, 2004.

BRANDILEONE, M. C.; DE ANDRADE, A. L.; DI FABIO, J. L.; GUERRA, M. L.; AUSTRIAN, R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 8, p. 1206-1212, 2003.

BRANDILEONE, M. C.; VIEIRA, V. S.; ZANELLA, R. C.; LANDGRAF, I. M.; MELLES, C. E.; TAUNAY, A.; DE MORAES, J. C.; AUSTRIAN, R. Distribution of serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolated from invasive infections over a 16-year period in the greater Sao Paulo area, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 10, p. 2789-2791, 1995.

BRATCHER, P. E.; KIM, K. H.; KANG, J. H.; HONG, J. Y.; NAHM, M. H.. Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. **Microbiology**, v. 156, Pt 2, p. 555-560, 2010.

BRIDY-PAPPAS, A. E.; MARGOLIS, M. B.; CENTER, K. J.; ISAACMAN, D. J. *Streptococcus pneumoniae*: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment, and prevention. **Pharmacotherapy**, v. 25, n. 9, p. 1193-1212, 2005.

BRILES, D. E.; CLAFLIN, J. L.; SCHROER, K.; FORMAN, C. Mouse IgG3 antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*. **Nature**, v. 294, n. 5836, p. 88-90, 1981.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; KING, J.; SWIFT, A.; BRAUN, P. A.; PARK, M. K.; FERGUSON, L. M.; NAHM, M. H.; NABORS, G. S. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. **J. Infect. Dis.**, v. 182, n. 6, p. 1694-1701, 2000a.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; NABORS, G. S.; PATON, J. C.; BROOKS-WALTER, A. The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v. 19, p. S87-95, 2000b. Suppl 1.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; PATON, J. C.; ADES, E. W.; NOVAK, L.; VAN GINKEL, F. W.; BENJAMIN JR, W. H. 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.**, v. 188, n. 3, p. 339-348, 2003.

BRILES, D. E.; KING, J. D.; GRAY, M. A.; MCDANIEL, L. S.; SWIATLO, E.; BENTON, K. A. PspA, a protection-eliciting pneumococcal protein: immunogenicity of isolated native PspA in mice. **Vaccine**, v. 14, n. 9, p. 858-867, 1996.

BROWN, E. J.; HOSEA, S. W.; FRANK, M. M. The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. **Rev. Infect. Dis.**, v. 5, p. S797-805, 1983. Suppl 4.

BRUEGGEMANN, A. B.; GRIFFITHS, D. T.; MEATS, E.; PETO, T.; CROOK, D. W.; SPRATT, B. G. Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 9, p. 1424-1432, 2003.

BRUNDAGE, J. F. Interactions between influenza and bacterial respiratory pathogens: implications for pandemic preparedness. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 6, n. 5, p. 303-312, 2006.

BUTLER, J. C.; BREIMAN, R. F.; CAMPBELL, J. F.; LIPMAN, H. B.; BROOME, C. V.; FACKLAM, R.R. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy: An evaluation of current recommendations. **JAMA**, v. 270, n. 15, p. 1826-1831, 1993.

CARMO, T. S. **Otimização da Produção do Polissacarídeo Capsular do *Streptococcus pneumoniae* Sorotipo 6B em Biorreator**. 2010. 128 f. Tese (Doutorado). Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CARROLL, M.C. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 16, p. 545-568, 1998.

CARROLL, M.C. The complement system in B cell regulation. **Mol. Immunol.**, v. 41, p. 141-146, 2004.

CARVALHO JR, R. **Produção e Purificação de um Fragmento Recombinante da Proteína A de Superfície do Clado 3 (PspA3) de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli***. 2009. 581 f. Tese (Mestrado). Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CHANG, B.; OTSUKA, T.; IWAYA, A.; OKAZAKI, M.; MATSUNAGA S.; WADA A.. Isolation of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 6C and 6D from the nasopharyngeal mucosa of healthy Japanese children. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 63, n. 5, p. 381-383, 2010.

CHERIAN, T. WHO expert consultation on serotype composition of pneumococcal conjugate vaccines for use in resource-poor developing countries, 26-27 October 2006, Geneva. **Vaccine**, v. 25, n. 36, p. 6557-6564, 2007.

CHIBUK, T. K.; ROBINSON, J. L.; HARTFIELD, D. S. Pediatric complicated pneumonia and pneumococcal serotype replacement: trends in hospitalized children pre and post introduction of routine vaccination with Pneumococcal Conjugate Vaccine (PCV7). **Eur. J. Pediatr.**, v. 169, n. 9, p. 1123-1128, 2010.

CHU, R. S.; MCCOOL, T.; GREENSPAN, N. S.; SCHREIBER, J. R.; HARDING C. V. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants for pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccines and enhance antipolysaccharide immunoglobulin G2a (IgG2a) and IgG3 antibodies. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 3, p. 1450-1456, 2000.

COWAN, M. J.; AMMANN, A. J.; WARA, D. W.; HOWIE, V. M.; SCHULTZ, L.; DOYLE N.; KAPLAN M. Pneumococcal polysaccharide immunization in infants and children. **Pediatrics**, v. 62, n. 5, p. 721-727, 1978.

CRANE, D. T.; BOLGIANO, B.; JONES, C. Comparison of the diphtheria mutant toxin, CRM197, with a *Haemophilus influenzae* type-b polysaccharide-CRM197 conjugate by optical spectroscopy. **Eur. J. Biochem.**, v. 246, n. 2, p. 320-327, 1997.

CRESSWELL, P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 12, p. 259-293, 1994.

CSORDAS, F. C.; PERCIANI, C. T.; DARRIEUX, M.; GONCALVES, V. M.; CABRERA-CRESPO, J.; TAKAGI, M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; LEITE, L. C.; TANIZAKI M. M. Protection induced by pneumococcal surface protein A (PspA) is enhanced by conjugation to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. **Vaccine**, v. 26, n. 23, p. 2925-2929, 2008.

DAGAN, R.; GIVON-LAVI, N.; ZAMIR, O.; SIKULER-COHEN, M.; GUY, L.; JANCO, J.; YAGUPSKY, P.; FRASER, D. Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine to toddlers attending day care centers. **J. Infect. Dis.**, v. 185, n. 7, p. 927-936, 2002.

DAMMERS, P.M.; DE BOER, N.K.; DEENEN, G.J.; NIEUWENHUIS, P.; KROESE, F.G.M. the origino f marginal zone B cells in the rat. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 1522-1531, 1999.

DANIELS, C. C.; BRILES, T. C.; MIRZA, S.; HAKANSSON, A. P.; BRILES, D. E. Capsule does not block antibody binding to PspA, a surface virulence protein of *Streptococcus pneumoniae*. **Microb. Pathog.**, v. 40, n. 5, p. 228-233, 2006.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

DUBOS, F.; MARECHAL, I.; HUSSON, M. O.; COUROUBLE, C.; AUREL, M.; MARTINOT, A. Decline in pneumococcal meningitis after the introduction of the heptavalent-pneumococcal conjugate vaccine in northern France. **Arch. Dis. Child.**, v. 92, n. 11, p. 1009-1012, 2007.

DUGGAN, S. T. Pneumococcal polysaccharide conjugate vaccine (13-valent, adsorbed) [prevenar 13(R)]. **Drugs**, v. 70, n. 15, p. 1973-1986, 2010.

EKSTROM, N.; VAKEVAINEN, M.; VERHO, J.; KILPI, T.; KAYHTY, H. Functional antibodies elicited by two heptavalent pneumococcal conjugate vaccines in the Finnish Otitis Media Vaccine Trial. **Infect. Immun.**, v. 5, n. 4, p. 1794-1800, 2007.

FAIRCHILD, R. L.; BRALEY-MULLEN, H. Characterization of the murine immune response to type 6 pneumococcal polysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 39, n. 2, p. 615-622, 1983.

FARKAS, P.; BYSTRICKY, S.. Efficient activation of carboxyl polysaccharides for the preparation of conjugates. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 187–190, 2007.

FERREIRA, D. M.; DARRIEUX, M.; OLIVEIRA, M. L.; LEITE, L. C.; MIYAJI, E. N.. Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein a is characterized by a balanced immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, n. 3, p. 499-505, 2008.

FIGLIORE, A. E.; LEVINE, O. S.; ELLIOTT, J. A.; FACKLAM, R. R.; BUTLER, J. C. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine for preschool-age children with chronic disease. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 5, n. 6, p. 828-831, 1999.

FOY, T. M.; LAMAN, J. D.; LEDBETTER, J. A.; ARUFFO, A.; CLAASSEN, E.; NOELLE, R. J. gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 1, p. 157-163, 1994.

FRASCH, C. E. Production and control of *Neisseria meningitidis* vaccines. **Adv. Biotechnol. Processes**, v. 13, p. 123-145, 1990.

FRASCH, C. E. Preparation of bacterial polysaccharide-protein conjugates: analytical and manufacturing challenges. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6468-6470, 2009.

FUKASAWA, L. O.; GORLA, M. C.; SCHENKMAN, R. P.; GARCIA, L. R.; CARNEIRO, S. M.; RAW, I.; TANIZAKI, M. M. *Neisseria meningitidis* serogroup C polysaccharide and serogroup B outer membrane vesicle conjugate as a bivalent meningococcus vaccine candidate. **Vaccine**, v. 17, n. 23-24, p. 2951-2958, 1999.

FUKUYAMA, Y.; KING, J. D.; KATAOKA, K.; KOBAYASHI, R.; GILBERT, R. S.; OISHI, K.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES D. E.; FUJIIHASHI, K. Secretory-IgA antibodies play an important role in the immunity to *Streptococcus pneumoniae*. **J. Immunol.**, v. 185, n. 3, p. 1755-1762, 2010.

GERMAIN, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 287-299, 1994.

GOR, D. O.; DING, X.; BRILES, D. E.; JACOBS, M. R.; GREENSPAN, N. S. Relationship between surface accessibility for PpmA, PsaA, and PspA and antibody-

mediated immunity to systemic infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 3, p. 1304-1312, 2005.

GORDON, S. B.; IRVING, G. R.; LAWSON, R. A.; LEE M. E.; READ, R. C. Intracellular trafficking and killing of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 4, p. 2286-2293, 2000.

GOULART, C.; DARRIEUX, M.; RODRIGUEZ, D.; PIMENTA, F. C.; BRANDILEONE, M. C.; DE ANDRADE A. L.; LEITE L. C. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**, v. 29, n. 8, p. 1634-1642, 2011.

GRIFFIOEN, A. W.; RIJKERS, G. T.; JANSSENS-KORPELA, P.; ZEGERS, B. J. Pneumococcal polysaccharides complexed with C3d bind to human B lymphocytes via complement receptor type 2. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 5, p. 1839-1845, 1991.

GUTTORMSEN, H. K.; SHARPE, A. H.; CHANDRAKER, A. K.; BRIGTSEN, A. K.; SAYEGH, M. H.; KASPER, D. L. Cognate stimulatory B-cell-T-cell interactions are critical for T-cell help recruited by glycoconjugate vaccines. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 12, p. 6375-6384, 1999.

HAMMERSCHMIDT, S.; BETHE, G.; REMANE, P. H.; CHHATWAL, G. S. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 4, p. 1683-1687, 1999.

HAUSDORFF, W. P.; SIBER, G. R.; PARADISO, P. R. **Patent application title: Multivalent Pneumococcal Polysaccharide-Protein Conjugate Composition.** Charlotte, NC US: Wyeth. 2009.

HEALTH PROTECTION AGENCY. Cumulative weekly number of reporters of invasive pneumococcal disease due to any of the seven serotypes in PrevenarTM: children aged < 2 years in England and Wales by epidemiological year: July-June (2003 to date), 2008. Disponível em: <<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/Pneumococcal/EpidemiologicalDataPneumococcal>>. Acesso em: 15 Nov 2010.

HENCKAERTS, I.; DURANT N.; DE GRAVE, D.; SCHUERMAN, L.; POOLMAN, J. Validation of a routine opsonophagocytosis assay to predict invasive pneumococcal

disease efficacy of conjugate vaccine in children. **Vaccine**, v. 25, n. 13, p. 2518-2527, 2007.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. San Diego: Academic Press, 1996.
HICKS, L. A.; HARRISON, L. H.; FLANNERY, B.; HADLER, J. L.; SCHAFFNER, W.; CRAIG, A. S.; JACKSON, D.; THOMAS, A.; BEALL, B.; LYNFIELD, R.; REINGOLD, A.; FARLEY, M. M.; WHITNEY, C. G. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. **J. Infect. Dis.**, v. 196, n. 9, p. 1346-1354, 2007.

HOLLINGSHEAD, S. K.; BARIL, L.; FERRO, S.; KING, J.; COAN, P.; BRILES, D. E. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, Pt 2, p. 215-221, 2006.

HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 10, p. 5889-5900, 2000.

HWANG, Y.; NAHM, M. H.; BRILES, D. E.; THOMAS, D.; PURKERSON, J. M. Acquired, but not innate, immune responses to *Streptococcus pneumoniae* are compromised by neutralization of CD40L. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 2, p. 511-517, 2000.

HYAMS, C.; CAMBERLEIN, E.; COHEN, J. M.; BAX, K.; BROWN, J. S. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 2, p. 704-715, 2010.

JANSEN, W. T.; HOGENBOOM, S.; THIJSSSEN, M. J.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F.; VERHOEF, J.; SNIPPE, H.; VERHEUL, A. F. Synthetic 6B di-, tri-, and tetrasaccharide-protein conjugates contain pneumococcal type 6A and 6B common and 6B-specific epitopes that elicit protective antibodies in mice. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 2, p. 787-793, 2001.

JEDRZEJAS, M. J.; LAMANI, E.; BECKER, R. S. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 35, p. 33121-33128, 2001.

JOHNSON, W. C. Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. **Proteins-Structure Function and Genetics**, v. 35, n. 3, p. 307-312, 1999.

JUNG, S. H.; CHOI, S. J.; KIM, H. J.; MOON, T. W. Molecular characteristics of bovine serum albumin-dextran conjugates. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, n. 9, p. 2064-2070, 2006.

KADIOGLU, A.; COWARD, W.; COLSTON, M. J.; HEWITT, C. R.; ANDREW, P. W. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 5, p. 2689-2697, 2004.

KAMBOJ, K. K.; KIRCHNER, H. L.; KIMMEL, R.; GREENSPAN, N. S.; SCHREIBER, J. R. Significant variation in serotype-specific immunogenicity of the seven-valent *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-CRM197 conjugate vaccine occurs despite vigorous T cell help induced by the carrier protein. **J. Infect. Dis.**, v. 187, n. 10, p. 1629-1638, 2003.

KARMA, P.; LUOTONEN, J.; TIMONEN, M.; PONTYNEN, S.; PUKANDER, J.; HERVA, E.; GRONROOS, P.; LEINONEN, M.; SIBAKOV, M.; MAKELA, P. H. Efficacy of pneumococcal vaccination against recurrent otitis media. Preliminary results of a field trial in Finland. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. Suppl.**, v. 89, n. 3, Pt 2, p. 357-362, 1980.

KELLNER, J. D.; CHURCH, D. L.; MACDONALD, J.; TYRRELL, G. J.; SCHEIFELE, D. Progress in the prevention of pneumococcal infection. **CMAJ**, v. 173, n. 10, p. 1149-1151, 2005.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119-139, 2005.

KHAN, A. Q.; LEES, A.; SNAPPER, C. M. Differential regulation of IgG anti-capsular polysaccharide and antiprotein responses to intact *Streptococcus pneumoniae* in the presence of cognate CD4+ T cell help. **J. Immunol.**, v. 172, n. 1, p. 532-539, 2004.

KIM, J. O.; WEISER, J. N. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 177, n. 2, p. 368-377, 1998.

KLEIN, D. L.; ELLIS, W. E. Conjugate vaccine against *Streptococcus pneumonia*. In: **Levine, M.M.; Woodrow, G.C.; Kaper, J.B.; Cobon, G.S. New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1997.

KNISKERN, P. J.; HAGOPIAN, A.; BURKE, P.; SCHULTZ, L. D.; MONTGOMERY, D. L.; HURNI, W. M.; IP, C. Y.; SCHULMAN, C. A.; MAIGETTER, R. Z.; WAMPLER D. E.; et al. Characterization and evaluation of a recombinant hepatitis B vaccine expressed in yeast defective for N-linked hyperglycosylation. **Vaccine**, v. 12, n. 11, p. 1021-1025, 1994.

KREISMAN, L. S.; FRIEDMAN, J. H.; NEAGA, A.; COBB B. A. Structure and function relations with a T-cell-activating polysaccharide antigen using circular dichroism. **Glycobiology**, v. 17, n. 1, p. 46-55, 2007.

KUCH, A.; SADOWY, E.; SKOCZYNSKA, A.; HRYNIEWICZ, W. First report of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6D isolates from invasive infections. **Vaccine**, v. 28, n. 39, p. 6406-6407, 2010.

KUNISHIMA, M.; KAWACHI, C.; HIOKI, K.; TERAOKA, K.; TANI, S. Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol- and watersoluble condensing agent: DMT-MM. **Tetrahedron**, v. 57, p. 1551-1558, 2001.

KUMARARATNE, D.S.; MACLENNAN, I.C.M. Cells of the marginal zone of the spleen are lymphocytes derived from recirculating precursors. **Eur. J. Immunol.**, v. 11, p. 865-869, 1981.

LAFERRIERE, C. A.; SOOD, R. K.; DE MUYS, J. M.; MICHON, F.; JENNINGS, H. J. The synthesis of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of chain length on immunogenicity. **Vaccine**, v. 15, n. 2, p. 179-186, 1997.

LAVAL, C. B.; DE ANDRADE, A. L.; PIMENTA, F. C.; DE ANDRADE, J. G.; DE OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; DE LIMA, E. C.; FABIO, J. L.; CASAGRANDE, S. T.; BRANDILEONE, M. C. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 12, n. 1, p. 50-55, 2006.

LEACH, A. J.; MORRIS, P. S.; MCCALLUM, G. B.; WILSON, C. A.; STUBBS, L.; BEISSBARTH, J.; JACUPS, S.; HARE, K.; SMITH-VAUGHAN, H. C. Emerging

pneumococcal carriage serotypes in a high-risk population receiving universal 7-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent polysaccharide vaccine since 2001. **BMC Infect. Dis.**, v. 9, p. 121, 2009.

LEE, C. J.; LEE, L. H.; FRASCH, C. E. Protective immunity of pneumococcal glycoconjugates. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 29, n. 4, p. 333-349, 2003.

LEES, A.; SEM, G.; LOPEZACOSTA, A. Versatile and efficient synthesis of protein-polysaccharide conjugate vaccines using aminooxy reagents and oxime chemistry. **Vaccine**, v. 24, n. 6, p. 716-729, 2006.

LEONARD, E. G.; CANADAY, D. H.; HARDING, C. V.; SCHREIBER, J. R. Antigen processing of the heptavalent pneumococcal conjugate vaccine carrier protein CRM(197) differs depending on the serotype of the attached polysaccharide. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 7, p. 4186-4189, 2003.

LI, J.; GLOVER, D. T.; SZALAI, A. J.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. PspA and PspC minimize immune adherence and transfer of pneumococci from erythrocytes to macrophages through their effects on complement activation. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 12, p. 5877-5885, 2007.

LIN, H.; LIN, Z.; MENG, C.; HUANG, J.; GUO, Y. Preparation and immunogenicity of capsular polysaccharide-surface adhesin A (PsaA) conjugate of *Streptococcus pneumoniae*. **Immunobiology**, v. 215, n. 7, p. 545-550, 2009.

LINARES, J.; ARDANUY, C.; PALLARES R.; FENOLL A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, n. 5, p. 402-410, 2010.

LORTHIOIS, A. P. A. **Desenvolvimento de processo para obtenção do método de conjugação do polissacarídeo capsular de Haemophilus influenzae tipo b com toxóide tetânico.** 2007. 152 f. Tese (Doutorado). Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

LUCAS, A. H.; GRANOFF, D. M.; MANDRELL, R. E.; CONNOLLY, C. C.; SHAN, A. S.; POWERS, D. C. Oligoclonality of serum immunoglobulin G antibody responses to *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide serotypes 6B, 14, and 23F. **Infect. Immun.**, v. 65, n. 12, p. 5103-5109, 1997.

MACLEOD, C. M.; HODGES, R. G.; HEIDELBERGER, M.; BERNHARD, W. G. Prevention of Pneumococcal Pneumonia by Immunization with Specific Capsular Polysaccharides. **J. Exp. Med.**, v. 82, n. 6, p. 445-465, 1945.

McHEYZER-WILLIAMS, M.; McHEYZER-WILLIAMS, L.; PANUS, J.; POGUE-CALEY, R.; BIKAH, G.; DRIVER, D.; EISENBRAUN, M. Helper T-cell-regulated B-cell immunity. **Microbes and Infect.**, v. 5, p. 205-212, 2003.

MANGTANI, P.; CUTTS, F.; HALL, A. J. Efficacy of polysaccharide pneumococcal vaccine in adults in more developed countries: the state of the evidence. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 2, p. 71-78, 2003.

MARTNER, A.; SKOVBJERG, S.; PATON, J. C.; WOLD, A. E. *Streptococcus pneumoniae* autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 9, p. 3826-3837, 2009.

MCCOOL, T. L.; HARDING, C. V.; GREENSPAN, N. S.; SCHREIBER, J. R. B- and T-cell immune responses to pneumococcal conjugate vaccines: divergence between carrier- and polysaccharide-specific immunogenicity. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4862-4869, 1999.

MCDANIEL, L. S.; MCDANIEL, D. O.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. Comparison of the PspA sequence from *Streptococcus pneumoniae* EF5668 to the previously identified PspA sequence from strain Rx1 and ability of PspA from EF5668 to elicit protection against pneumococci of different capsular types. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 10, p. 4748-4754, 1998.

MCDANIEL, L. S.; RALPH, B. A.; MCDANIEL, D. O.; BRILES, D. E. Localization of protection-eliciting epitopes on PspA of *Streptococcus pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260. **Microb. Pathog.**, v. 17, n. 5, p. 323-337, 1994.

MCDANIEL, L. S.; SHEFFIELD, J. S.; DELUCCHI, P.; BRILES, D. E. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 1, p. 222-228, 1991.

MEHTA, S. Developing the right pneumococcal vaccine for the time and place. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 83, n. 3, p. 449-450, 2010.

MELIN, M.; JARVA, H.; SIIRA, L.; MERI, S.; KAYHTY, H.; VAKEVAINEN, M. *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype 19F is more resistant to C3 deposition and less sensitive to opsonophagocytosis than serotype 6B. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 2, p. 676-684, 2009.

MELIN, M.; TRZCINSKI, K.; ANTONIO, M.; MERI, S.; ADEGBOLA, R.; KAIJALAINEN, T.; KAYHTY, H.; VAKEVAINEN, M. Serotype related variation in susceptibility to complement deposition and opsonophagocytosis among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 12, p. 5252-2261, 2010a.

MELIN, M.; TRZCINSKI, K.; MERI, S.; KAYHTY, H.; VAKEVAINEN, M. The capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* is more important than the genetic background for resistance to complement. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 12, p. 5262-2270, 2010b.

MIYAJI, E. N.; DIAS, W. O.; TANIZAKI, M. M.; LEITE, L. C. Protective efficacy of PspA (pneumococcal surface protein A)-based DNA vaccines: contribution of both humoral and cellular immune responses. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 37, n. 1, p. 53-57, 2003.

MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, A. P.; BRANDILEONE, M. C.; DIAS, W. O.; LEITE, L. C.. Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5086-5090, 2002.

MOND, J.J.; LEES, A.; SNAPPER, C.M. T cell-independent antigens type 2. **Annu. Rev. Immunol.**, v.13, p. 655-692, 1995.

MORENO, R. L.; SAMPSON, J. S.; ROMERO-STEINER, S.; WONG, B.; JOHNSON, S. E.; ADES, E.; CARLONE, G. M. A murine model for the study of immune memory in response to pneumococcal conjugate vaccination. **Vaccine**, v. 22, n. 23-24, p. 3069-3079, 2004.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Guilbenkian, 2005. 1510 p.

MUNOZ-ALMAGRO, C.; JORDAN, I.; GENE, A.; LATORRE, C.; GARCIA-GARCIA, J. J.; PALLARES, R. Emergence of invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine

serotypes in the era of 7-valent conjugate vaccine. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 2, p. 174-182, 2008.

O'BRIEN, K. L.; MILLAR, E. V.; ZELL, E. R.; BRONSDON, M.; WEATHERHOLTZ, R.; REID, R.; BECENTI, J.; KVAMME, S.; WHITNEY, C. G.; SANTOSHAM, M. Effect of pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization among immunized and unimmunized children in a community-randomized trial. **J. Infect. Dis.**, v. 196, n. 8, p. 1211-1220, 2007.

O'BRIEN, K. L.; WOLFSON, L. J.; WATT, J. P.; HENKLE, E.; DELORIA-KNOLL, M.; MCCALL, N.; LEE, E.; MULHOLLAND, K.; LEVINE, O. S.; CHERIAN, T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, n. 9693, p. 893-902, 2009.

OCHS, M. M.; BARTLETT, W.; BRILES, D. E.; HICKS, B.; JURKUVENAS, A.; LAU, P.; REN, B.; MILLAR, A. Vaccine-induced human antibodies to PspA augment complement C3 deposition on *Streptococcus pneumoniae*. **Microb. Pathog.**, v. 44, n. 3, p. 204-214, 2008.

OLIVER, A.M.; MARTIN, F.; KEARNEY, J.F. IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. **J. Immunol.**, v. 162, p. 7198-7207, 1999.

PALACIOS, G.; HORNIG, M.; CISTERNA, D.; SAVJI, N.; BUSSETTI, A. V.; KAPOOR, V.; HUI, J.; TOKARZ, R.; BRIESE, T.; BAUMEISTER, E.; LIPKIN, W. I. *Streptococcus pneumoniae* coinfection is correlated with the severity of H1N1 pandemic influenza. **PLoS One**, v. 4, n. 12, p.e 8540, 2009.

PARAMESWAR, A. R.; PARK, I. H.; SAKSENA, R.; KOVAC, P.; NAHM, M. H.; DEMCHENKO, A. V. Synthesis, conjugation, and immunological evaluation of the serogroup 6 pneumococcal oligosaccharides. **Chembiochem.**, v. 10, n. 18, p. 2893-2899, 2009.

PARK, I. H.; MOORE, M. R.; TREANOR, J. J.; PELTON, S. I.; PILISHVILI, T.; BEALL, B.; SHELLY, M. A.; MAHON, B. E.; NAHM, M. H. Differential effects of pneumococcal vaccines against serotypes 6A and 6C. **J. Infect. Dis.**, v. 198, n. 12, p. 1818-1822, 2008.

PARK, I. H.; PARK, S.; HOLLINGSHEAD, S. K.; NAHM, M. H. Genetic basis for the new pneumococcal serotype, 6C. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 9, p. 4482-4489, 2007a.

PARK, I. H.; PRITCHARD, D. G.; CARTEE, R.; BRANDAO, A.; BRANDILEONE, M. C.; NAHM, M. H. Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 4, p. 1225-1233, 2007b.

PEETERS, C. C.; TENBERGEN-MEEKES, A. M.; HAAGMANS, B.; EVENBERG, D.; POOLMAN, J. T.; ZEGERS, B. J.; RIJKERS, G. T. Pneumococcal conjugate vaccines. **Immunol. Lett.**, v. 30, n. 2, p. 267-274, 1991.

PELTON, S. I.; LOUGHLIN, A. M.; MARCHANT, C. D. Seven valent pneumococcal conjugate vaccine immunization in two Boston communities: changes in serotypes and antimicrobial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 23, n. 11, p. 1015-1022, 2004.

PIMENTA, F. C.; MIYAJI, E. N.; AREAS, A. P.; OLIVEIRA, M. L.; DE ANDRADE, A. L.; HO, P. L.; HOLLINGSHEAD, S. K.; LEITE, L. C. Intranasal immunization with the cholera toxin B subunit-pneumococcal surface antigen A fusion protein induces protection against colonization with *Streptococcus pneumoniae* and has negligible impact on the nasopharyngeal and oral microbiota of mice. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 8, p. 4939-4944, 2006.

POLAND, G. A. The burden of pneumococcal disease: the role of conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, n. 13-14, p. 1674-1679, 1999.

POOLMAN, J. T. Pneumococcal vaccine development. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 3, n. 5, p. 597-604, 2004.

PRICE, K. E.; CAMILLI, A. Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 7, p. 2163-2168, 2009.

QI, X. Y.; KEYHANI, N. O.; LEE, Y. C. Spectrophotometric determination of hydrazine, hydrazides, and their mixtures with trinitrobenzenesulfonic acid. **Anal. Biochem.**, v. 175, n. 1, p. 139-144, 1988.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat. Immunol.**, v. 11, n. 9, p. 785-797, 2010.

ROBINSON, D. A.; BRILES, D. E.; CRAIN, M. J.; HOLLINGSHEAD, S. K. Evolution and virulence of serogroup 6 pneumococci on a global scale. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 22, p. 6367-6375, 2002.

RUBIN, J. L.; MCGARRY, L. J.; STRUTTON, D. R.; KLUGMAN, K. P.; PELTON, S. I.; GILMORE, K. E.; WEINSTEIN, M. C. Public health and economic impact of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) in the United States. **Vaccine**, v. 28, n. 48, p. 7634-7643, 2010.

SCHLOTTMANN, S. A.; JAIN, N.; CHIRMULE, N.; ESSER, M. T. A novel chemistry for conjugating pneumococcal polysaccharides to Luminex microspheres. **J. Immunol. Methods**, v. 309, n. 1-2, p. 75-85, 2006.

SCHNEERSON, R.; ROBBINS, J. B.; PARKE, J. C.; BELL, C.; SCHLESSELMAN, J. J.; SUTTON, A.; WANG, Z.; SCHIFFMAN, G.; KARPAS, A.; SHILOACH, J. Quantitative and qualitative analyses of serum of serum antibodies elicited in adults by Haemophilus influenza type b and pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. **Infect. Immun.**, v. 52, p. 519-528, 1986.

SCHUERMAN, L.; PRYMULA, R.; HENCKAERTS, I.; POOLMAN, J. ELISA IgG concentrations and opsonophagocytic activity following pneumococcal protein D conjugate vaccination and relationship to efficacy against acute otitis media. **Vaccine**, v. 25, n. 11, p. 1962-1968, 2007.

SCOTT, J. A. The global epidemiology of childhood pneumonia 20 years on. **Bull World Health Organ**, v. 86, n. 6, p. 494-496, 2008.

SEHGAL, D.; VIJAY, I. K. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. **Anal. Biochem.**, v. 218, n. 1, p. 87-91, 1994.

SEN, G.; CHEN, Q.; SNAPPER, C. M. Immunization of aged mice with a pneumococcal conjugate vaccine combined with an unmethylated CpG-containing oligodeoxynucleotide restores defective immunoglobulin G antipolysaccharide responses and specific CD4⁺-T-cell priming to young adult levels. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 4, p. 2177-2186, 2006.

SHAFFER, D. E.; TOLL, B.; SCHUMAN, R. F.; NELSON, B. L.; MOND, J. J.; LEES, A. Activation of soluble polysaccharides with 1-cyano-4-dimethylaminopyridinium tetrafluoroborate (CDAP) for use in protein-polysaccharide conjugate vaccines and immunological reagents. II. Selective crosslinking of proteins to CDAP-activated polysaccharides. **Vaccine**, v. 18, n. 13, p. 1273-1281, 2000.

SILVA, M.; CABRERA-CRESPO, J.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; MIYAJI, E. N.; HO, P. L.; LEITE, L. C.; LOPES, A. P. Optimizing expression of *Streptococcus pneumoniae* surface protein a, PspA: serocross-reactivity within families of antisera induced against clades 1 and 3. **Mol. Biotechnol.**, v. 37, n. 2, p. 146-154, 2007.

SILVEIRA, I. A.; BASTOS, R. C.; NETO, M. S.; LARANJEIRA, A. P.; ASSIS, E. F.; FERNANDES, S. A.; LEAL, M. L.; SILVA, W. C.; LEE, C. H.; FRASCH, C. E.; PERALTA, J. M.; JESSOUROUN, E. Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide-activated tetanus toxoid. **Vaccine**, v. 25, n. 41, p. 7261-7270, 2007.

SOLEY, C.; ARGUEDAS, A. Understanding the link between pneumococcal serotypes and invasive disease. **Vaccine**, v. 27, p. C19-21, 2009. Suppl 3.

SUN, Y.; HWANG, Y.; NAHM, M. H. Avidity, potency, and cross-reactivity of monoclonal antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide serotype 6B. **Infect. Immun.**, v. 69, n. 1, p. 336-344, 2001.

TALKINGTON, D. F.; CRIMMINS, D. L.; VOELLINGER, D. C.; YOTHER, J.; BRILES, D. E. A 43-kilodalton pneumococcal surface protein, PspA: isolation, protective abilities, and structural analysis of the amino-terminal sequence. **Infect. Immun.**, v. 59, n. 4, p. 1285-1289, 1991.

THOMPSON, C. B.; SCHER, I.; SCHAEFER, M. E.; LINDSTEN, T.; FINKELMAN, F. D.; MOND, J. J. Size-dependent B lymphocyte subpopulations: relationship of cell volume to surface phenotype, cell cycle, proliferative response, and requirements for antibody production to TNP-Ficoll and TNP-BA. **J. Immunol.**, v. 133, n. 5, p. 2333-2342, 1984.

TILLET, W. S.; AVERY, O. T.; GOEBEL, W. F. Chemo-Immunological Studies on Conjugated Carbohydrate-Proteins : iii. Active and Passive Anaphylaxis with Synthetic Sugar-Proteins. **J. Exp. Med.**, v. 50, n. 5, p. 551-567, 1929.

TIMENS, W.; BOES, A.; ROZEBOOM-UITERWIJK, T.; POPPEMA, S. Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response. **J. Immunol.**, v. 143, n. 10, p. 3200-3206, 1989.

TU, A. H.; FULGHAM, R. L.; MCCRORY, M. A.; BRILES, D. E.; SZALAI, A. J. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4720-4724, 1999.

TUOMANEN, E. I.; AUSTRIAN, R.; MASURE, H. R. Pathogenesis of pneumococcal infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 19, p. 1280-1284, 1995.

TYLLIANAKIS, P. E.; KAKABAKOS, S. E.; EVANGELATOS, G. P.; ITHAKISSIOS, D. S. Direct colorimetric determination of solid-supported functional groups and ligands using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v. 219, n. 2, p. 335-340, 1994.

VARVIO, S. L.; AURANEN, K.; ARJAS, E.; MAKELA, P. H. Evolution of the capsular regulatory genes in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 200, n. 7, p. 1144-1151, 2009.

VESIKARI, T.; WYSOCKI, J.; CHEVALLIER, B.; KARVONEN, A.; CZAJKA, H.; ARSENE, J. P.; LOMMEL, P.; DIEUSSAERT, I.; SCHUERMAN, L. Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) compared to the licensed 7vCRM vaccine. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, n. 4, p. S66-76, 2009. Suppl.

VOS, Q.; LEES, A.; WU, Z.Q.; SNAPPER, C.M.; MOND, J.J. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. **Immunol. Rev.**, v. 176, p. 154-170, 2000.

WATSON, D. A.; MUSER, D. M. A brief history of the pneumococcus in biomedical research. **Semin. Respir. Infect.**, v. 14, n. 3, p. 198-208, 1999.

WESSELS, M. R.; PAOLETTI, L. C.; KASPER, D. L.; DIFABIO, J. L.; MICHON, F.; HOLME, K.; JENNINGS, H. J. Immunogenicity in animals of a polysaccharide-protein conjugate vaccine against type III group B Streptococcus. **J. Clin. Invest.**, v. 86, n. 5, p. 1428-1433, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Acute Respiratory Infections. 2009. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/print.html>. Acesso em 02 Feb. 2011.

WILLIAMS, B. G.; GOUWS, E.; BOSCHI-PINTO, C.; BRYCE, J.; DYE, C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. **Lancet. Infect. Dis.**, v. 2, n. 1, p. 25-32, 2002.