THIAGO ROJAS CONVERSO

**ESTUDO DO TRANSPORTADOR DE
POLIAMINAS, PotD, E SEUS HÍBRIDOS COMO
ANTÍGENOS VACINAIS CONTRA *Streptococcus*
*pneumoniae***

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

São Paulo
2016

THIAGO ROJAS CONVERSO

**ESTUDO DO TRANSPORTADOR DE
POLIAMINAS, PotD, E SEUS HÍBRIDOS COMO
ANTÍGENOS VACINAIS CONTRA *Streptococcus*
*pneumoniae***

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Luciana Cezar de Cerqueira Leite

São Paulo
2016

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rojas Converso, Thiago
ESTUDO DO TRANSPORTADOR DE POLIAMINAS, PotD, E
SEUS HÍBRIDOS COMO ANTÍGENOS VACINAIS CONTRA
Streptococcus pneumoniae / Thiago Rojas Converso;
orientadora Luciana Cezar de Cerqueira Leite. --
São Paulo, 2016.
119 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *S. pneumoniae*. 2. Vacina Proteica. 3.
Transportador de Poliaminas. I. Cezar de Cerqueira
Leite, Luciana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato: Thiago Rojas Converso

Título da tese: ESTUDO DO TRANSPORTADOR DE POLIAMINAS, PotD,
E SEUS HÍBRIDOS COMO ANTÍGENOS VACINAIS
CONTRA *Streptococcus pneumoniae*

Orientadora: Profa. Dra Luciana Cezar de Cerqueira Leite

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

☐ **Aprovado**

☐ **Reprovado**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "O Estudo do transportador de poliamina, PotD, como antígeno vacinal contra *streptococcus pneumoniae*", protocolo nº 899/12, sob a responsabilidade de Luciana Cezar de Cerqueira Leite e Thiago Rojas Converso - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/2/2015.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie	Observação
12/2013 - 02/2017 Laboratório de Biotecnologia	570 Camundongos Balb/c (F)	Alteração de vigência

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015

Dra. Wafar H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

A todos os anjos que Deus colocou
na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Paulo e Estelita e meus irmãos Paula e Hugo, pelo grande amor, por terem me apoiado, ajudado e estarem ao meu lado desde sempre. Amo muito vocês. Vocês são meus exemplos!

À minha nova família. Michelle, minha querida, obrigado por sempre estar do meu lado, por todo o apoio, paciência e atenção que você tem me dado. Por todos os conselhos, pelos incentivos e pelo amor. Sou muito grato por tudo. E obrigado por me apresentar ao Felipe que é uma pessoinha muito especial e sempre tem uma coisa nova ou um experimento diferente para mostrar. Obrigado pelas risadas, Oreia! Passar esse tempo com vocês tem sido um aprendizado maravilhoso, amo vocês!

À toda família de Bragança e Mococa por todos os ensinamentos, pelo apoio e principalmente pelo amor. Apesar da distância sempre que nos reunimos é uma grande festa.

À vó Kita e vô Diogo, tio Mauricio e ao vô Beto, que não estão mais aqui, mas que com certeza iriam se orgulhar dessa conquista.

Aos meus amigos Andre, Marcelo e Victor por todos os anos de amizade. Obrigado por todos os churrascos e conselhos. Tenho muito orgulho do que nos tornamos. Vocês são meus irmãos!

À Dra Luciana por ter me acolhido em seu laboratório e ter me dado essa oportunidade. Obrigado por todos os ensinamentos e ajuda durante todos esses anos.

À Dra Cibelly que desde que entrei no laboratório sempre foi uma mãe para mim, dividiu sua bancada e seus ensinamentos comigo, muito obrigado!

Ao Dr Alex pela ajuda e conselhos para esse trabalho e pelos papos cervejeiros, receitas e experiências trocadas.

A todos os colegas que passaram ou ainda estão no laboratório, Ivan, Dunia, Carina, Mayra e Nayara, Leo, Tereza, Rafa, Larissa, Henrique e Ju, por todos os conselhos e por sempre estarem lá para ajudar na hora do aperto. Muito obrigado, gente!

A todos do Centro do Biotecnologia que ajudaram a tornar esse trabalho possível, Darlene, Cris, Carmem, Fátima, Solange, Marlene, Arleide, Toninho, André, Marisa, Mirian.

A todos que me ajudaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Doutorado Direto – Processo 2012/04286-3).

“You're going to find that many of the truths we cling to depend greatly on our own point of view.” (**Obi-Wan**)

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota” (**Madre Teresa de Calcutá**)

RESUMO

CONVERSO, T. R. **O estudo de transportador de poliaminas, PotD, e seus híbridos como antígenos vacinais contra *Streptococcus pneumoniae*.** 2016. 119 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A Proteína Transportadora de Poliaminas (PotD) é um antígeno importante para a virulência de *Streptococcus pneumoniae in vivo*, capaz de proteger camundongos imunizados contra infecção sistêmica, além de reduzir a colonização da nasofaringe dos animais. Porém, visando ampliar a cobertura vacinal, a combinação com outros antígenos da bactéria se faz necessária. Este trabalho teve como objetivo aprofundar o estudo sobre a resposta imune gerada contra a proteína PotD, sozinha ou em fusão com duas outras proteínas pneumocócicas: o derivado de Pneumolisina, PdT, e a proteína de superfície de pneumococo A (PspA). Para tanto, os genes *potD*, *pdT* e *pspA* foram clonados e expressos, sozinhos ou fusionados, gerando as proteínas híbridas rPotD-PdT e rPspA-PotD. As proteínas recombinantes e os híbridos foram utilizados na imunização subcutânea de camundongos BALB/c, gerando elevados níveis de anticorpos. O soro dos animais imunizados foi capaz de reconhecer e se ligar à superfície de diferentes isolados de pneumococos, e de ampliar a fagocitose da bactéria por células peritoneais murinas *in vitro*. Em todos os ensaios, os híbridos se mostraram mais eficazes do que as proteínas isoladas, induzindo anticorpos capazes de potencializar a fagocitose dos pneumococos. A resposta imune celular foi caracterizada pela produção de INF- γ , IL-2 e IL-17 pelos esplenócitos, e um aumento na produção de NO pelos fagócitos peritoneais dos animais imunizados. Apesar dos resultados promissores *in vitro*, a proteína rPotD-PdT não foi capaz de induzir proteção em nenhum dos modelos avaliados; em contraste, a fusão rPspA-PotD foi capaz de proteger os camundongos contra sepse por dois isolados virulentos de pneumococo, além de reduzir a colonização na nasofaringe. Por fim, demonstramos que a adição das poliaminas transportadas por PotD, espermidina e putrescina, à cultura de pneumococos interfere na formação de biofilme *in vitro*. Considerando o importante papel da formação de biofilmes na colonização, este resultado sugere um possível mecanismo de ação da PotD durante a colonização por pneumococo. Em conjunto, os resultados deste estudo sugerem que a utilização de uma formulação híbrida, rPspA-PotD, compreende uma estratégia vacinal promissora, capaz de proteger contra colonização e sepse pneumocócica, pela produção de anticorpos opsonizantes e ativação de citocinas protetoras, como IL-17.

Palavras chaves: *S. pneumoniae*. Vacina proteica. Transportador de poliaminas.

ABSTRACT

CONVERSO, T. R. **The study of the polyamine transporter, PotD, and its hybrids as vaccine antigens against *Streptococcus pneumoniae***. 2016. 119 p. Ph.D thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Polyamine Transporter D (PotD) is an important antigen for *Streptococcus pneumoniae* virulence *in vivo*, protecting immunized mice against systemic infection and reducing the bacterial load in the nasopharynx of immunized animals. However, in order to extend vaccine coverage, the combination of PotD with other antigens of the bacterium is required. The present study aimed at expanding the investigation of the immune response generated against PotD alone or fused with two other pneumococcal proteins: the Pneumolysin derivative, PdT and Pneumococcal Surface Protein A (PspA). Therefore, the *potD*, *pdt* and *pspA* genes were cloned and expressed, either alone or in fusion, generating the hybrid proteins rPotD-PdT and rPspA-PotD. The recombinant proteins and hybrids were used for subcutaneous immunization of BALB/c mice, generating high levels of antibodies. Sera from immunized animals were able to recognize and bind onto the surface of different pneumococcal strains, and to enhance phagocytosis of the bacterium *in vitro*. In all tests, the hybrids were more effective than the isolated proteins. The cellular immune response was characterized by the production of INF- γ , IL-2 and IL-17 by splenocytes and increased production of NO by peritoneal cells of the immunized animals. Despite promising results *in vitro*, rPotD-PdT protein was not able to induce protection in any of the tested challenge models. In contrast, rPspA-PotD fusion was able to protect mice against sepsis with two virulent isolates of pneumococcus and led to reduction in bacterial loads in the nasopharynx of challenged animals. Finally, we demonstrate that the addition of exogenous polyamines, spermidine, and putrescine, in the pneumococcal culture interfered with biofilm formation *in vitro*. Considering the important role of biofilm formation for successful colonization, this result suggests a possible mechanism of action of PotD during colonization by pneumococcus. Taken together, the results suggest that the use of the hybrid rPspA-PotD comprises a promising vaccine strategy, able to protect against colonization and pneumococcal sepsis, through the production of opsonizing antibodies and activation of protective cytokines, such as IL-17.

Keywords: *S. pneumoniae*. Proteins based Vaccine. Polyamine transporter.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Rota patogênica da infecção por <i>S. pneumoniae</i>	23
Figura 2 - Esquema linear da estrutura de PspA.	28
Figura 3 - Modelo da estrutura da PLY.....	31
Figura 4 - Estrutura proposta para o complexo PotABCD de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	32
Figura 5- Análise da proteína recombinante PotD purificada e separada por SDS-PAGE.....	53
Figura 6 - Quantificação de anticorpos do tipo IgG anti-rPotD.....	54
Figura 7 – Resposta imune celular induzida pela administração de rPotD.....	55
Figura 8 – Análise funcional dos anticorpos anti-PotD.	56
Figura 9 - Colonização da nasofaringe de camundongos após desafio intranasal.....	57
Figura 10 - Análise por SDS-PAGE dos fragmentos purificados de rPspAs de família 2	58
Figura 11 - Análise da reatividade cruzada de PspAs em extrato de pneumococo por anticorpos anti-rPspA de família 2.....	59
Figura 12 - Aumento relativo da deposição do componente C3 na superfície bacteriana após a incubação com os respectivos soros.	61
Figura 13 - Opsonofagocitose de pneumococos in vitro na presença de anticorpos anti-rPspAs.....	62
Figura 14 - Análise das proteínas híbridas por SDS-PAGE e Western blot.	64
Figura 15 – Quantificação de anticorpos induzidas pela imunização de camundongos com r-PspA-PotD, rPspA ou rPotD por ELISA.....	66
Figura 16 - Quantificação de anticorpos (IgG total) contra rPotD e rPdT nos soros de animais imunizados com rPotD-PdT.....	67
Figura 17 – Ligação dos anticorpos anti-rPotD-PdT e suas proteínas isoladas à superfície de pneumococos.....	68
Figura 18 - Ligação dos anticorpos contra o híbrido rPspA-PotD e suas proteínas isoladas, à superfície de pneumococos.....	70
Figura 19 – Fagocitose de pneumococos in vitro mediada por anticorpos induzidos contra a proteína híbrida rPspA-PotD.....	72
Figura 20 – Fagocitose de pneumococos in vitro mediada por anticorpos induzidos contra a proteína híbrida rPotD-PdT.	73
Figura 21 - Produção de óxido nítrico pelas células peritoneais de camundongos imunizados, induzida pela administração de rPotD-PdT.....	74
Figura 22 – Produção de citocinas no sobrenadante dos esplenócitos dos animais imunizados com rPotD-PdT.	75

Figura 23 – Análise da produção da citocina IL-17 nos animais imunizados com rPspA-PotD.	76
Figura 24 – Tempo de sobrevivência (em dias) dos animais imunizados após desafio intranasal com <i>S. pneumoniae</i>.....	78
Figura 25– Colonização da nasofaringe de camundongos imunizados com rPspa-PotD ou rPotD-PdT após desafio intranasal.....	79
Figura 26 - Formação de biofilme por <i>S. pneumoniae</i> in vitro na presença de poliaminas.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> utilizadas.....	36
Tabela 2 - Deposição do complemento na superfície bacteriana após incubação com os soros anti-PspAs.....	60
Tabela 3 - Opsonofagocitose de cepas de <i>S. pneumoniae</i> contendo PspAs de diferentes clados na presença de soro de animais imunizados com as rPspAs.....	63

LISTA DE SIGLAS

μm, Micrometro

μL, Microlitro

μM, Micro molar

μg, Micrograma

ng, Nano grama

2YT, meio de cultura 2 x extrato de levedura e triptona

Al(OH)₃, Hidróxido de alumínio

BSA, albumina do soro bovino

C1q, proteína C1q do sistema complemento

C3, proteína C3 do sistema complemento

CBA, do inglês “*cytometric beads array*”

CDR, Região definidora de clados

CEUAIB, Comissão de Ética no Uso de Animais/ Instituto Butantan

ConA, Concanavalina A

DMEM/F12, meio Eagle Modificado por Dulbecco + Nutriente HAM F-12

DNA, ácido desoxirribonucleico

E. coli, *Escherichia coli*

ELISA, ensaio imunoenzimático

FITC, Isotiocianato de fluoresceína

FMUSP, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

g, gravidade

GAVI, Aliança Mundial para Vacinas e Imunização

HBSS, solução-tampão salina de Hank

HRP, peroxidase de raiz forte

IFN-γ, Interferon-gama

IgA, Imunoglobulina A

IgG, Imunoglobulina G

IL, Interleucina

Ile-tRNA, Isoleucina t RNA

IPTG, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kDa, kilodaltons

LB, meio Luria-Bertani

mA, miliamper

mL, mililitro

mm, milímetro

mM, milimolar

MHC, complexo de histocompatibilidade principal

MPLA, monofosforil lipídeo A

N, Normal

NaCl, cloreto de sódio

NMS, soro normal de camundongo

NON-PRO, bloco sem a presença do aminoácido prolina

OMS, Organização Mundial da Saúde

OPA, ensaio de morte opsonofagocitose

OPD, orto-fenilendiamina dicloridrato

PBS, solução salina tamponada

PcpA, proteína ligante de colina A

PCR, reação em cadeia da polimerase

PCV10, vacina pneumocócica 10-valente

PdT, pneumolisóide com 3 mutações

PhtD, histidine triad protein

PLY, pneumolisina

PotD, Proteína Transportadora de Poliamina D

PS, polissacarídeo

PspA, proteína de superfície de pneumococo A

PspC, proteína de superfície de pneumococo C

RPMI, meio de cultura desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute

SBF, soro bovino fetal

SDS-PAGE, eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio

St, do inglês “*strain*”

TBS-T, tampão Tris salino + 0,5% Tween-20

Th1, Th2, Th17, Resposta auxiliar do tipo 1, 2 e 17

TLR4, Receptor do tipo Toll 4

TNF- α , Fator de necrose tumoral alfa

U, Unidade

UFC, unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Patogênese de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	21
1.2 Papel do biofilme na patogênese de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	23
1.3 Vacinas contra <i>S. pneumoniae</i>	25
1.4 PspA, Pneumolisina e PotD, como candidatos vacinais contra <i>S. pneumoniae</i> ..	28
2 OBJETIVOS	35
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos específicos	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS.	36
3.1 Aspectos éticos.....	36
3.2 Cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> e condições de crescimento.	36
3.3 Caracterização da resposta imune induzida pela proteína PotD	37
3.3.1 Produção da proteína PotD recombinante.....	38
3.3.1.1 Amplificação e clonagem.....	38
3.3.1.2 Expressão.....	39
3.3.1.3 Purificação.....	39
3.3.2 Análise da resposta imune induzida pela proteína rPotD.....	40
3.3.2.1 Análise da produção de anticorpos anti-rPotD.....	40
3.3.2.2 Produção de óxido nítrico induzido pela administração de rPotD.....	40
3.3.2.3 Produção de citocinas no baço dos animais imunizados.....	41
3.3.2.4 Ligação de anticorpos anti-rPotD à superfície de pneumococos.....	42
3.3.2.5 Ensaio opsonofagocítico na presença dos anticorpos gerados pela imunização com a proteína rPotD.....	42
3.4 Construção e avaliação imune das proteínas híbridas rPotD-PdT e rPspA-PotD.	43
3.4.1 Seleção de uma molécula de PspA de família 2 para fusão com PotD.....	43
3.4.1.1 Avaliação da reatividade dos anticorpos por imunoblot.....	44
3.4.1.2 Ligação dos anticorpos contra diferentes rPspAs à superfície de pneumococos.....	45
3.4.1.3 Ensaio opsonofagocítico na presença dos anticorpos gerados pelas imunizações.....	45
3.4.2 Construção das fusões rPspA-PotD e rPotD-PdT.....	45
3.4.3 Produção das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	46

3.4.4 <i>Análise da resposta imune induzida pela administração dos híbridos rPotD-PdT e rPspA-PotD</i>	46
<u>3.4.4.1. Imunização e análise da produção de anticorpos específicos</u>	46
<u>3.4.4.2 Reconhecimento das proteínas híbridas rPotD-PdT e rPspA-PotD por anticorpos anti-rPotD, anti-rPdT e anti-rPspA</u>	47
<u>3.4.4.3 Produção de óxido nítrico pelas células peritoneais dos animais imunizados</u>	47
<u>3.4.4.4 Produção de citocinas no baço dos animais imunizados</u>	47
<u>3.4.4.5 Ligação dos anticorpos à superfície de pneumococos</u>	48
<u>3.4.4.6 Ensaio opsonofagocítico</u>	49
3.5 Avaliação da proteção conferida pelas vacinas.....	49
3.5.1 <i>Ensaio de desafio intranasal de colonização</i>	49
3.5.2 <i>Ensaio de desafio intranasal de sepse</i>	50
3.6 Avaliação da influência de PotD sobre a formação de biofilme por <i>Streptococcus pneumoniae</i>	50
3.6.1 <i>Quantificação da formação de biofilme in vitro</i>	50
3.7 Análise estatística	51
4 RESULTADOS	53
4.1 Análise da resposta imune induzida pelas imunizações com a proteína rPotD...53	
4.1.1 <i>Produção e purificação da proteína rPotD</i>	53
4.1.2 <i>Avaliação da resposta imune induzida pela administração da proteína recombinante PotD</i>	53
4.1.3 <i>Reconhecimento da bactéria e opsonofagocitose mediados por anticorpos anti-rPotD</i>	56
4.1.4 <i>Proteção conferida pela imunização com rPotD em modelo de colonização</i>	57
4.2 Construção das proteínas híbridas PspA-PotD e PotD-PdT	57
4.2.1 <i>Seleção de uma molécula de PspA de família 2 para fusão com PotD</i>	57
<u>4.2.1.1 Produção e purificação das diferentes PspA</u>	57
<u>4.2.1.2 Avaliação da reatividade cruzada induzida por soros anti-PspAs por immunoblotting</u>	58
<u>4.2.1.3 Avaliação da deposição de complemento na superfície de pneumococos em presença de soro anti-rPspA</u>	60
<u>4.2.1.4 Ensaio de opsonofagocitose na presença de anticorpos anti-rPspA</u>	61
4.2.2 <i>Clonagem, produção e purificação das proteínas híbridas rPspA-PotD e rPotD-PdT</i>	63
4.3 Avaliação da resposta imune induzida pela imunização com os híbridos.....	65
4.3.1 <i>Avaliação da resposta humoral induzida pelas imunizações</i>	65

4.3.2 Ensaio de ligação dos anticorpos à superfície de pneumococos.....	67
4.3.4 Ensaio de opsonofagocitose de pneumococos na presença do soro dos animais imunizados com os híbridos.....	71
4.3.5 Avaliação da produção de óxido nítrico por células do peritônio em cultura.....	74
4.3.6 Determinação da produção de citocinas por ELISA.....	75
4.4 Avaliação da proteção conferida pelas vacinas híbridas	77
4.4.1 Ensaio de desafio letal.....	77
4.4.2 Ensaio de colonização.....	78
4.5 Investigação do papel de poliaminas na formação de biofilme por <i>S. pneumoniae</i> <i>in vitro</i>	79
5 DISCUSSÃO	82
6 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICE.....	112

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é uma bactéria Gram positiva, encapsulada e comensal, que coloniza o trato respiratório superior humano. Em alguns casos, o pneumococo é capaz de invadir as vias aéreas inferiores, atingindo os pulmões onde é o principal causador de pneumonia. A bactéria pode causar também otite média e em casos mais graves, meningite e bacteremia. É uma bactéria de grande importância mundial, sendo anualmente responsável por 14,5 milhões de casos de doenças invasivas, e aproximadamente 800.000 mortes em crianças menores de cinco anos (O'BRIEN et al., 2009). No Brasil, o Ministério da Saúde relatou, entre 2000 e 2008, 7.129.291 internações por pneumonias, sendo que 45% eram crianças menores de cinco anos, correspondendo a uma frequência média anual de 2.100 internações/100.000 habitantes no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2012).

As vacinas pneumocócicas atualmente em uso, baseadas nos polissacarídeos capsulares, apresentam cobertura limitada e/ou custo de produção elevado, que dificultam sua implementação em diversas regiões do globo, nas quais os impactos das infecções por esta bactéria são mais extensos.

Neste contexto, a busca por estratégias vacinais alternativas, capazes de garantir maior amplitude de proteção com custo reduzido, é de grande importância para a saúde pública. Dentre as formulações vacinais em estudo, o uso de proteínas da superfície da bactéria, sozinhas ou combinadas entre si ou a outros componentes microbianos, destaca-se como uma abordagem promissora na prevenção das doenças causadas pelo pneumococo. Diversas proteínas têm sido investigadas como candidatos para inclusão em uma vacina pneumocócica (DARRIEUX et al., 2015), dentre elas a Proteína Transportadora de Poliaminas D (PotD), a proteína de superfície A de pneumococo (PspA) e a Pneumolisina (PLY), alvos do presente estudo.

1.1 Patogênese de *Streptococcus pneumoniae*

A colonização da nasofaringe corresponde ao primeiro evento na patogênese do pneumococo, e precede todas as doenças causadas pela bactéria. A colonização ocorre durante a infância e persiste assintomaticamente em indivíduos saudáveis na idade adulta (CHAO et al., 2014; GRAY et al., 1981). O pneumococo coloniza a nasofaringe de aproximadamente 90% das crianças e por volta de 15% dos adultos. Por essa razão, as taxas de transmissão de pneumococos são maiores nas crianças em comparação aos

adultos, com aproximadamente 20–50% de transmissão entre crianças e 5-20% em adultos nos países mais desenvolvidos, enquanto nos países em desenvolvimento, até 90% das crianças e mais de 50% dos adultos são colonizados (ALLEGRUCCI et al., 2006; CHAO et al., 2014; HENRIQUES-NORMARK; NORMARK, 2010; REVAI; MAMIDI; CHONMAITREE, 2008).

A transmissão da bactéria está diretamente relacionada aos níveis de colonização, e ocorre através de aerossóis oriundos de indivíduos colonizados (portadores assintomáticos) (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004). Dessa forma, ao contrário do que ocorre com outras doenças respiratórias como o sarampo – onde a infecção pelo vírus sempre leva à doença, a maior parte da cadeia de transmissão do pneumococo é invisível, por não incluir sintomas (DONKOR, 2013). Após o contato com a mucosa do hospedeiro, o pneumococo poderá colonizar a nasofaringe de forma assintomática (KHAN; PICHICHERO, 2014; SLEEMAN et al., 2006) ou, sob certas circunstâncias (que incluem fatores do hospedeiro e do microrganismo, além da presença de outros micróbios na nasofaringe), invadir nichos estéreis do hospedeiro, desencadeando diversas doenças (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004). A variação de fase – um processo no qual os pneumococos alteram o perfil de expressão de fatores de virulência, alternando sua morfologia entre formas transparentes e opacas, desempenha um papel fundamental na progressão da colonização para a doença invasiva (ARAI et al., 2011; WEISER et al., 1994). Um perfil “transparente” corresponde a uma menor produção de cápsula e maior expressão de adesinas, e está mais associado à colonização, enquanto as formas opacas são resistentes à fagocitose e prevalecem nos pacientes com doença invasiva (TUOMANEN, 1997).

A conversão da colonização assintomática para doença está associado à produção local de mediadores inflamatórios como interleucina 1 e TNF, como observado durante infecções virais (TUOMANEN, 1997). Outros fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de infecções pneumocócicas são a má nutrição, fumo, asplenia, cirrose e deficiências congênitas envolvendo imunoglobulinas ou componentes do sistema complemento e AIDS (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004; CUNDELL et al., 1995; HAKANSSON et al., 1994; PLOTKOWSKI et al., 1986). Na presença de uma ou mais dessas condições, os pneumococos ganham acesso ao pulmão por aspiração, onde aderem a células alveolares (TUOMANEN; AUSTRIAN; MASURE, 1995). A progressão para pneumonia se dá pela fagocitose ineficiente, que leva à multiplicação do patógeno nos

alvéolos e liberação de citocinas no fluido bronqueoalveolar. Segue-se um processo inflamatório intenso – mediado por componentes da parede celular da bactéria – com recrutamento de macrófagos e neutrófilos e liberação de óxido nítrico, causando danos ao tecido pulmonar (AUSTRIAN, 1984; BERGERON et al., 1998). Se a multiplicação bacteriana persiste, a resposta inflamatória exacerbada provoca a formação de edema e acúmulo de fibrina, podendo levar o paciente à morte (NOVAK; TUOMANEN, 1999). No caso das doenças pneumocócicas invasivas – como septicemia e meningite – as bactérias podem atingir a corrente sanguínea através do tecido pulmonar lesionado, ou diretamente, via sistema linfático. Do sangue, os pneumococos infectam as meninges. Também pode ocorrer a passagem das bactérias diretamente da cavidade nasal para o cérebro, conforme demonstrado por van Ginkel e cols; neste modelo, os pneumococos inoculados por via nasal ligaram-se aos gangliosídeos pela interação com ácido teicóico presente na parede celular bacteriana, atingindo o cérebro por transporte via axônio através dos nervos olfatórios, sem passagem pela corrente sanguínea (VAN GINKEL et al., 2003). Outras doenças causadas por *S. pneumoniae* incluem peritonite, empiema e artrite, porém são pouco frequentes. A Figura 1 sumariza as rotas envolvidas na infecção por pneumococo.

Figura 1 – Rota patogênica da infecção por *S. pneumoniae*. Adaptado de Bogaert e colaboradores, 2004.

1.2 Papel do biofilme na patogênese de *Streptococcus pneumoniae*

Biofilmes são comunidades microbianas sésseis, altamente estruturadas, que permanecem aderidas a uma superfície e envoltas por uma matriz extracelular composta

por um polímero (DONLAN; COSTERTON, 2002). A formação de biofilmes é um processo complexo e altamente organizado, que envolve ampla comunicação entre os microrganismos e interações com o hospedeiro (VIDAL et al., 2011).

Os biofilmes desempenham um papel fundamental nas infecções bacterianas, por fornecerem um ambiente protegido do ataque imune (PARSEK; SINGH, 2003), e por atuarem como reservatórios, permitindo a disseminação dos microrganismos para outros sítios do hospedeiro (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005).

Em *Streptococcus pneumoniae*, a formação do biofilme é importante tanto para a colonização da nasofaringe quanto para a doença invasiva (SHAK et al., 2013; SHAK; VIDAL; KLUGMAN, 2013). Em estudo avaliando a formação de biofilmes *in vivo*, Blanchette-Cain e cols detectaram a presença de agregados microbianos na porção posterior do septo nasal de camundongos, após a inoculação nasal de pneumococos (BLANCHETTE-CAIN et al., 2013). A colonização por pneumococo também leva à formação de biofilme na nasofaringe dos seres humanos. Pneumococos em biofilmes são altamente resistentes a agentes antimicrobianos e este fenótipo pode ser induzido quando a bactéria é cultivada em células epiteliais respiratórias sob as mesmas condições encontradas no ambiente da nasofaringe (CHAO et al., 2014). Sob a forma de biofilmes, os pneumococos exibem baixos níveis de virulência *in vivo* e proporcionam um ambiente ideal para a maior troca genética, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com maior transformação natural vista durante a co-colonização de múltiplas cepas. Biofilmes também foram detectados em superfícies mucosas durante infecção do ouvido médio, sinusite e pneumonia (ALLEGRUCCI et al., 2006; CHAO et al., 2014; SHAK; VIDAL; KLUGMAN, 2013; YADAV; CHAE; SONG, 2012). Embora apresentem baixa virulência nestes sítios, a presença dos biofilmes em nichos previamente estéreis do hospedeiro no curso das doenças pneumocócicas, permite a dispersão da bactéria, dificultando sua eliminação pelo sistema imune (CHAO et al., 2014).

Estudos avaliando a contribuição de componentes bacterianos para a formação do biofilme sugerem a participação de múltiplas estruturas. A análise da formação de biofilme *in vitro* revelou que bactérias mutantes negativas para as proteínas LytA, LytC, LytB, CbpA, PcpA e PspA apresentaram uma capacidade reduzida de formar biofilmes em placas de poliestireno, enquanto os antígenos Pce e CbpD não demonstraram ser importantes (DOMENECH et al., 2015; MOSCOSO; GARCIA; LOPEZ, 2006). A presença de cápsula polissacarídica também afetou negativamente a formação de biofilme, enquanto a presença

de resíduos de fosfocolina na parede celular se mostrou essencial para a integridade do biofilme (DOMENECH et al., 2015). Em modelo de formação de biofilme *in vivo*, a utilização de bactérias mutantes para diversos fatores de virulência revelou que as proteínas CiaRH, PsrP, e SpxB são importantes para a formação de biofilme em camundongos, enquanto CbpA, LytA, LuxS, e pneumolisina não se mostraram essenciais (BLANCHETTE-CAIN et al., 2013). Em outro estudo, foi observado que mutantes negativos para neuraminidase A (NanA) falharam em formar biofilmes *in vivo*, mas não *in vitro* (BLANCHETTE et al., 2016). Este resultado foi atribuído à variação na disponibilidade de carboidratos na mucosa nasal em comparação com as condições *in vitro*, e reflete as variações observadas entre a nasofaringe e a corrente sanguínea; as superfícies mucosas apresentam uma maior quantidade de galactose, enquanto no sangue predomina a glicose. Dessa forma, a habilidade de NanA em expor os resíduos de galactose na superfície das células epiteliais favorece a formação de biofilme e, conseqüentemente, a colonização (BLANCHETTE et al., 2016). Este resultado sugere que a disponibilidade de carboidratos está relacionada à formação de biofilmes na nasofaringe, fornecendo as bases metabólicas que regulam a ativação deste processo pelo pneumococo.

Devido ao seu papel central na colonização da nasofaringe pelo pneumococo, um maior conhecimento sobre a influência de fatores de virulência bacterianos (como a proteína foco deste estudo, PotD) na formação do biofilme poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos responsáveis pelo efeito protetor destas proteínas.

1.3 Vacinas contra *S. pneumoniae*.

Considerado o principal fator de virulência do pneumococo, a cápsula polissacarídica recobre toda a superfície da bactéria, protegendo-a contra a fagocitose pelo sistema imune do hospedeiro (YOTHER, 2011). Esta, porém, é uma estrutura altamente variável, tendo como base as diferentes composições e estruturas químicas dos polissacarídeos. Até o presente, foram identificados mais de 93 sorotipos, que foram agrupados em 48 grupos sem reatividade cruzada entre si (GENO et al., 2015; YOTHER, 2011).

Devido à sua elevada imunogenicidade em adultos jovens e alta eficácia protetora, os polissacarídeos capsulares constituem atualmente a base das vacinas disponíveis contra o pneumococo. Porém, a vacinação por PS induz uma resposta imune do tipo T-independente, que é ineficiente em crianças com menos de 2 anos e em indivíduos

imunocomprometidos. (LEINONEN et al., 1986; O'BRIEN, 1996). A ausência de resposta do tipo T-auxiliar contra os PS é devida à impossibilidade de interação entre os PS e as moléculas de MHC Classe II, presentes nas células apresentadoras de antígenos (APCs). Em idosos, este tipo de vacina tem uma eficácia reduzida (AUSTRIAN; GOLD, 1964; LEINONEN et al., 1986). Além da eficácia limitada nos grupos de maior risco, as vacinas polissacarídicas não induzem memória imunológica, e por este motivo a revacinação se faz necessária a cada cinco anos. Outro problema é o fato de a vacina não induzir proteção contra otite média, uma das consequências mais comuns da infecção por pneumococo (O'BRIEN, 1996).

A fim de possibilitar a indução de respostas imunes protetoras em crianças, foram desenvolvidas vacinas conjugadas, que contêm polissacarídeos quimicamente fusionados a proteínas carreadoras, essa conjugação torna a resposta imunológica contra o PS dependente de células T, capazes de induzir anticorpos protetores em crianças menores de 5 anos (KELLY; MOXON; POLLARD, 2004; POLAND, 1999). No ano 2000, foi licenciada sob o nome comercial Prevnar (Wyeth), a primeira vacina conjugada contra infecção pneumocócica; ela contém PS de 7 sorotipos, entre eles: 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Nesta formulação os PS foram conjugados com a toxina diftérica mutada, a CRM₁₉₇. A Prevnar mostrou-se eficaz contra doença invasiva em crianças com menos de 2 anos (GHAFFAR, 2005), sendo que ela é capaz de reduzir os níveis de colonização por todos os sorotipos vacinais (HANSEN et al., 2006). Um fator negativo com relação a essa formulação vacinal é que um reduzido número de PS está incluso na vacina devido a limitações impostas pelo processo de conjugação, tornando sua cobertura limitada (BRANDILEONE et al., 2003). Recentemente, outras duas formulações foram licenciadas e estão disponíveis para a venda: i) uma vacina 10-valente (Synflorix – GSK), que contém os polissacarídeos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F conjugados à proteína D de *H. influenzae*, o polissacarídeo 18C conjugado ao toxóide tetânico e o polissacarídeo 19F conjugado ao toxóide diftérico (GHAFFAR et al., 2004; VESIKARI et al., 2009), e ii) uma formulação 13-valente contendo os polissacarídeos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F, todos conjugados ao toxóide diftérico CRM₁₉₇ (Prevnar-Wyeth) (HICKS et al., 2007). Uma formulação 15-valente está em fase de testes; esta vacina contém os polissacarídeos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F e 33F conjugados ao toxóide diftérico CRM₁₉₇ (Merck & Co.) (SKINNER, 2010; SKINNER et al., 2011).

A vacina PCV-10 foi introduzida no ano de 2010 em calendário nacional. Em um estudo realizado na cidade de São Paulo com crianças entre 12 e 23 meses que comparou a ocorrência de pneumococos antes e após a introdução da vacina PCV-10, revelou que houve uma redução de 90,9% na ocorrência dos sorotipos vacinais, sendo que a eficácia da vacina foi de 97,3% (BRANDILEONE et al., 2016).

Estudos recentes têm avaliado o impacto da vacina 10 valente na colonização. Em Goiânia, uma pesquisa em crianças entre 7-11 meses e 15-18 meses, revelou que após a vacinação com 2 ou 3 doses de PCV-10, ocorreu uma redução na colonização de 35,9% e 44%, respectivamente. É importante ressaltar que entre os sorotipos identificados na nasofaringe, apenas 35,2% estão incluídos na vacina PCV-10, sendo eles o 6B (11,6%), 23F (7,8%) 14 (6,8%) e 19F (6,6%), contra 53% encontrados na PCV-13, onde inclui-se os sorotipos 6A (9,8%) e 19 A (6,3%); foram encontrados também sorotipos não vacinais como 6C (5,9%), 35B (4,3%), 11A (4,3%) e 15 C (3,3%) (ANDRADE et al., 2014). Avaliando o impacto dessa vacinação no número de hospitalizações, observou-se que após um ano da introdução da PCV-10 no SUS, houve uma redução média de 26,4% no número de internações causadas por pneumonia, entre crianças de 2 meses e dois anos, nas cidades de Belo Horizonte, Curitiba e Recife (AFONSO et al., 2013). No entanto, quando avaliado o impacto nacional na internação de crianças entre 0 e 4 anos, após 2 anos de vacinação, esse valor é reduzido para 12,65% (SCOTTA et al., 2014).

Apesar do desenvolvimento de vacinas cada vez mais abrangentes, quando considerado o número de sorotipos, ao longo do tempo, pode ocorrer uma alteração da prevalência dos sorotipos, fazendo com que os sorotipos menos frequentes atualmente passem a se tornar dominantes; isso levaria a uma redução da eficácia das vacinas existentes. De fato, uma alteração no espectro de prevalência dos sorotipos capsulares circulantes já vem sendo observada desde a introdução da vacina 7 valente nos EUA (VESIKARI et al., 2009). Nos EUA a vacina PCV-13 foi introduzida em 2013 e levou a diminuição dos casos de doenças invasivas causadas pelos sorotipos não cobertos pela vacina PCV-7 (CHANG et al., 2015).

Além das limitações apontadas das vacinas baseadas em polissacarídeos capsulares, estudos recentes tem descrito um aumento na prevalência de isolados de pneumococo sem cápsula (NESP) na mucosa de indivíduos colonizados, bem como em portadores de doença não-invasiva e invasiva (CRONEY et al., 2013; KELLER; ROBINSON; MCDANIEL, 2016). Este aumento dos Nesp (classificados em grupo I ou II com base no locus gênico

cps) pode ser consequência do uso das vacinas polissacarídicas, reforçando a necessidade de se estudar estratégias vacinais baseadas em outros antígenos da bactéria.

Neste cenário, as vacinas baseadas em proteínas pneumocócicas surgem como uma alternativa promissora, pela possibilidade de induzirem ampla cobertura vacinal, e de inibir diferentes etapas da infecção pneumocócica. Diversos estudos têm demonstrado que a coadministração de proteínas pneumocócicas ofereceu níveis de proteção superiores aos de proteínas administradas sozinhas. Esses resultados sugerem que uma formulação vacinal proteica eficiente contra infecções pneumocócicas deverá conter mais de uma proteína (BASAVANNA et al., 2009; DARRIEUX et al., 2015; POLISSI et al., 1998).

1.4 PspA, Pneumolisina e PotD, como candidatos vacinais contra *S. pneumoniae*.

A Proteína de Superfície Pneumocócica A (PspA), é um importante fator de virulência dos pneumococos (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000); expressa virtualmente em todas as cepas da bactéria, apresenta localização favorável à interação com anticorpos, pois está exposta na superfície da bactéria (JEDRZEJAS; LAMANI; BECKER, 2001). A região N-terminal corresponde à porção funcional da PspA, e projeta-se para fora da cápsula (GOR et al., 2005; MCDANIEL et al., 1994); em seguida, aparece uma região rica em prolinas, um domínio de ligação à colina (responsável pelo ancoramento da proteína na superfície da bactéria) e uma cauda C-terminal curta (Figura 2).

Figura 2 - Esquema linear da estrutura de PspA. A região N-terminal é composta pelas regiões A (A e A') e região B ou CDR, que formam a alfa-hélice com estrutura secundária *coiled coil*. Em seguida, aparecem a região rica em prolinas (PRR) e a região C-terminal, que contém 10 sequências repetidas de ligação à colina.

Na molécula de PspA, a região que contém a maior parte dos epítomos imunogênicos é a região N-terminal (MCDANIEL et al., 1994); diversos estudos demonstraram que a imunização com PspA (particularmente fragmentos incluindo a região N-terminal da molécula) é capaz de proteger camundongos contra colonização e sepse por

pneumococo (ARULANANDAM et al., 2001; BITSAKTSIS et al., 2012; CAMPOS et al., 2008; DANIELS et al., 2010; DARRIEUX et al., 2015; DARRIEUX et al., 2007; FERREIRA et al., 2006b; FERREIRA et al., 2010; TAI, 2006).

A porção N-terminal de PspA é variável, em especial os últimos 100 aminoácidos, conhecidos como “região definidora de clado” (CDR); esta região foi utilizada como base para a classificação da PspA em 3 famílias, que foram divididas em 6 clados. A família 1 contém os clados 1 e 2, a família 2 contém os clados 3, 4 e 5 e o clado 6 é o representante da família 3 (HAUSDORFF; SIBER; PARADISO, 2001). Dentro de cada família, a identidade nesta região é superior a 50%, enquanto moléculas com similaridade igual ou superior a 80% pertencem ao mesmo clado (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000). As PspAs de famílias 1 e 2 (especialmente os clados 1 a 4) são predominantes em todo o mundo (BEALL et al., 2000; VELA CORAL et al., 2001); no Brasil, estão presentes em 99% dos isolados clínicos (BRANDILEONE et al., 2004; PIMENTA et al., 2006). A variabilidade de PspA limita a amplitude da proteção conferida por vacinas baseadas nesta molécula. Estudos avaliando as respostas imunes induzidas por PspAs de diferentes clados e famílias sugerem uma variabilidade nos níveis de reconhecimento cruzado entre estas proteínas (DARRIEUX et al., 2008; GOULART et al., 2011; MORENO et al., 2010).

PspA inibe a deposição de C3b do sistema complemento na superfície da bactéria. Estudos mostram que a PspA tem a capacidade de inibir a formação de C3 convertase pela via alternativa, inibindo a opsonização por C3b, colaborando assim para a evasão da fagocitose pela bactéria (REN et al., 2004). Anticorpos anti-PspA foram capazes de bloquear a função inibitória de PspA sobre o sistema do complemento, favorecendo a opsonização e fagocitose do pneumococo (REN et al., 2004). PspA é um forte candidato a ser inserido na formulação de uma vacina pneumocócica, induzindo a produção de anticorpos que levem o sistema imune a combater a bactéria pelas duas principais vias: a via clássica (por sua porção Fc); e a via alternativa (por inativação das funções de PspA). No entanto, a variabilidade estrutural da proteína resulta em uma proteção limitada, reforçando a necessidade de se incluir mais de um fragmento desta proteína, bem como a combinação com outros antígenos mais conservados da bactéria, nas vacinas.

A pneumolisina (PLY) é uma proteína pertencente à família das toxinas ativadas por tiol (BERRY et al., 1995); liga-se ao colesterol da membrana de células eucarióticas onde sofre oligomerização, levando à formação de poros, que são responsáveis pela lise da célula infectada (BHAKDI; TRANUM-JENSEN, 1988).

PLY é uma proteína de 53 kDa, composta por 4 domínios ricos em folhas β (Figura 3) (ROSSJOHN et al., 1998). Primeiramente foi descrita como uma proteína citosólica, sendo liberada para o meio externo por autólise do pneumococo ou em algumas cepas, por mecanismos de exportação ainda não esclarecidos (BALACHANDRAN et al., 2001; BERRY et al., 1989). Estudos recentes demonstram que a PLY aparece também associada à parede celular (PRICE; CAMILLI, 2009; PRICE; GREENE; CAMILLI, 2012).

PLY apresenta vários efeitos inflamatórios: i) medeia a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , e sua instilação no pulmão de ratos foi capaz de reproduzir o processo inflamatório causado pela bactéria (BENTON; VANCOTT; BRILES, 1998; RUBINS et al., 1992); ii) Possui a capacidade de se ligar à porção Fc da IgG, levando à ativação da via clássica do sistema complemento na ausência de anticorpos específicos; iii) é capaz de induzir o “burst” respiratório em leucócitos polimorfonucleares (com liberação de TNF- α e óxido nítrico), quimiotaxia e atividade bactericida (JOHNSTON, 1981; MITCHELL et al., 1991; PATON; FERRANTE, 1983) e, iv) apresenta intensa atividade hemolítica.

PLY em sua forma nativa apresenta alta toxicidade, o que impede sua utilização como vacina; a fim de limitar os efeitos tóxicos desta proteína, diversas formas detoxificadas foram produzidas por mutagênese sitio dirigida ou detoxificação química (ALEXANDER et al., 1994; BERRY et al., 1995; DENOEL et al., 2011; PATON et al., 1991; SALHA et al., 2012), sendo denominadas pneumolisóides (DENOEL et al., 2011). O PdT é uma forma detoxificada por mutagênese; possui uma mutação no sítio de ativação de complemento Asp385Asn e duas mutações nos sítios responsáveis pela ligação da pneumolisina em resíduos de colesterol da membrana plasmática, Cys428Gly + Trp433Phe. Juntas, essas mutações inibem 100% da ativação do complemento e 99,9999% da atividade citolítica (BERRY et al., 1995; MITCHELL et al., 1991).

Figura 3 - Modelo da estrutura da PLY. A proteína é composta por 4 domínios ricos em folhas- β , o domínio 4 está relacionado com sua atividade citolítica e ativação de complemento. Fonte: Rossjohn et al, 1998.

A imunização com PLY ou pneumolisóides tem se mostrado protetora em camundongos quando desafiados por via intranasal ou intraperitoneal, enquanto a pré-incubação da PLY com anticorpos neutralizantes inibe sua capacidade de induzir inflamação quando instilada no pulmão (ALEXANDER et al., 1994; KIRKHAM et al., 2006; PATON; LOCK; HANSMAN, 1983; SALHA et al., 2012).

Malley e colaboradores demonstraram que a resposta imunológica inata induzida contra o pneumococo é mediada pela interação da PLY com *Toll like receptor-4* (TLR4), sendo que camundongos deficientes nesse receptor mostraram-se mais susceptíveis à infecção pneumocócica (MALLEY et al., 2003). Essa interação com receptores da resposta inata sugere um potencial efeito da PLY como adjuvante. Recentemente, um pneumolisóide denominado PLYD1 foi submetido a teste clínico de fase 1, mostrando-se imunogênico e seguro (KAMTCHOUA et al., 2013), além disso outro pneumolisóide, dPly, também está sendo avaliado em teste clínico de fase 2 (PRYMULA et al., 2014).

A Proteína Transportadora de Poliaminas D (PotD) é uma proteína pertencente ao complexo transportador de poliaminas denominado PotABCD, com significativa homologia ao operon Pot de *E. coli*; está exposta na superfície da bactéria e é expressa em virtualmente todas as cepas de *S. pneumoniae*. (BASAVANNA et al., 2009; IGARASHI; ITO; KASHIWAGI, 2001; IGARASHI; KASHIWAGI, 2000; SHAH et al., 2006; SHAH;

ROMERO; SWIATLO, 2008; SHAH; SWIATLO, 2006; WARE, 2005; WARE et al., 2006). Estudos baseados no alinhamento com proteínas similares de outras bactérias sugerem a função de cada proteína do complexo Pot. É previsto que a proteína PotA, por ter uma localização intracelular e sítios para ligação de ATP, tenha a função de fornecer energia para o complexo. As proteínas PotB e PotC contêm domínios helicoidais hidrofóbicos, uma característica típica de proteínas transmembrana; conclui-se portanto, que estejam localizadas neste domínio e possuam a função de formar um canal específico para as poliaminas, possibilitando assim a entrada das moléculas para o domínio intracelular; PotD de pneumococo possui um peptídeo sinal característico de Gram-positivos, sugerindo uma localização extracelular para esta molécula. Ensaio de fracionamento celular e citometria de fluxo confirmaram a presença da PotD na superfície de pneumococos (IGARASHI; KASHIWAGI, 2000; SHAH; ROMERO; SWIATLO, 2008; SHAH; SWIATLO, 2006). A proteína PotD possui um sítio de ligação para espermidina e putrecina, sugerindo assim, que a PotD é responsável por capturar essas poliaminas do meio extracelular (Figura 4) (SHAH et al., 2011).

Figura 4 - Estrutura proposta para o complexo PotABCD de *Streptococcus pneumoniae*. Neste complexo, a proteína PotA tem a função de ATPase, fornecendo energia para o complexo; as proteínas PotB e PotC têm a função de formar um canal no domínio transmembrana para o transporte das poliaminas; a proteína PotD tem a função de se ligar e capturar as poliaminas do domínio extracelular, transportando-as para o domínio intracelular através do canal formado por PotB e PotC. Fonte: Shah and Swiatlo, 2008.

As poliaminas são moléculas necessárias para o crescimento e desenvolvimento de todas as células (SHAH; ROMERO; SWIATLO, 2008; SHAH; SWIATLO, 2006). Fazem parte da família das poliaminas: a putrecina, espermidina, espermina, e a cadaverina. Essas moléculas estão associadas a uma grande variedade de processos fisiológicos, e interagem com os ácidos nucleicos, podendo modular as funções do RNA, DNA, trifosfatases nucleotídicas, síntese de proteínas, e substâncias relacionadas (IGARASHI; ITO;

KASHIWAGI, 2001; IGARASHI; KASHIWAGI, 2000; KASHIWAGI et al., 1996; WARE et al., 2006). A maior parte das funções celulares das poliaminas pode ser explicada por uma mudança estrutural do RNA que ocorre em concentrações fisiológicas de Mg^{2+} e K^+ , quando a maioria das poliaminas intracelulares se encontra complexada com RNA. Foram encontradas poliaminas que tem a finalidade de: i) modular a síntese de proteínas em vários níveis diferentes, incluindo a estimulação de tipos especiais de síntese proteica; ii) estimular o conjunto de subunidades ribossômicas 30S; e iii) estimular a formação de Ile-tRNA (IGARASHI; KASHIWAGI, 2000; KASHIWAGI et al., 1996; WARE, 2005; WARE et al., 2006).

A maioria das bactérias é capaz de sintetizar poliaminas a partir dos aminoácidos precursores; mas principalmente, são capazes de transportar as moléculas de poliaminas do ambiente para o domínio intracelular (IGARASHI; KASHIWAGI, 2000; SHAH et al., 2011; SHAH; SWIATLO, 2008; WARE et al., 2006). Estes dois mecanismos – biossíntese e transporte – regulam a concentração interna de poliaminas. A síntese de poliaminas é controlada, em parte, pela degradação da ornitina descarboxilase. Embora tenha sido mostrado que as poliaminas têm vários efeitos sobre a síntese proteica e a proliferação celular em todos os tipos de células, nem a síntese nem a captação de poliaminas foram ainda bem documentadas em pneumococo (WARE et al., 2006).

Recentemente foram publicados trabalhos utilizando vários microrganismos modelos que mostram a importância de proteínas transportadoras de poliaminas na formação de biofilme. Em *Escherichia coli*, a deleção do gene *potD* levou à diminuição na formação de biofilme quando comparada com a bactéria selvagem (ZHANG et al., 2013). Em *Yersinia pestis* e *Bacillus subtilis*, a redução dos níveis de poliaminas intracelular inibiu a formação de biofilme (BURRELL et al., 2010; PATEL et al., 2006). Outro estudo utilizando *Vibrio cholerae* mostrou que a deleção do gene *potD1* altera a formação de biofilme pela bactéria em comparação com a bactéria selvagem (MCGINNIS et al., 2009).

Estudo utilizando uma cepa de pneumococo *knockout* para o gene codificante de PotD, mostrou que essa proteína é essencial para o crescimento e virulência de cepas de pneumococo *in vivo*, embora não seja essencial para o crescimento da bactéria *in vitro* em meio rico. Acredita-se que, *in vitro*, a captação de poliaminas do meio extracelular não seja necessária para o crescimento dos pneumococos, sugerindo que em meio rico em nutrientes, a biossíntese de poliaminas pela bactéria seja suficiente para o seu crescimento. Porém, quando analisado o crescimento *in vivo*, a inativação do gene *potD* impede a

absorção das poliaminas do ambiente, e sua biossíntese não é suficiente, diminuindo a concentração das moléculas no meio intracelular e retardando o crescimento bacteriano, o que atenuaria significativamente a virulência das cepas (WARE, 2005; WARE et al., 2006). O papel essencial da PotD para o crescimento e virulência do pneumococo *in vivo*, somado à sua localização na superfície do pneumococo, a tornam um potencial candidato à inclusão em uma formulação vacinal juntamente com outras proteínas de pneumococo.

Dessa forma, o presente estudo avaliou o potencial de vacinas baseadas nas proteínas pneumocócicas PotD, PspA e PLY combinadas ou fusionadas, em modelos de sepse e colonização por pneumococo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo:

- Aprofundar o estudo sobre o potencial imunogênico da proteína PotD de *Streptococcus pneumoniae*, individualmente ou em fusão com duas outras proteínas de pneumococo – um derivado de pneumolisina (PdT) e uma PspA de família 2 – quanto à proteção induzida em camundongo contra infecção por *Streptococcus pneumoniae*.

- Avaliar a importância da proteína PotD para a bactéria durante a formação do biofilme, um processo envolvido no estabelecimento da colonização e na consequente invasão do hospedeiro pelo pneumococo.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir a proteína PotD recombinante e avaliar a resposta imune induzida por sua administração.
- Selecionar moléculas de PspA de família 2 (clados 3, 4 e 5), que apresentam maior reatividade/proteção cruzada dentro desta família
- Produzir híbridos da proteína PotD com o pneumolisóide PdT e com a PspA família 2 previamente selecionada.
- Avaliar a resposta humoral e celular induzida pela administração das proteínas híbridas, incluindo as propriedades funcionais dos anticorpos gerados, bem como avaliar o potencial protetor frente a modelos de desafio em camundongos
- Avaliar a formação de biofilme *in vitro* na presença das poliaminas espermidina e putrescina exógenas no meio de cultura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS.

3.1 Aspectos éticos

O projeto passou por avaliação do Comitê de Ética para Uso de Animais do Instituto Butantan CEUAIB, foi aprovado e registrado pelo número de protocolo: 899/12. Em todos os experimentos de imunização, foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas (5 animais por grupo) com idade entre 5 e 7 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina – USP. Os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração *ad libitum*. As imunizações foram realizadas por via subcutânea com os camundongos sob contenção manual. A coleta de sangue foi realizada pela via retro-orbital, com auxílio de pipetas de vidro. Os desafios foram realizados com os animais anestesiados com uma mistura contendo 1 µg de cetamina e 0,625 µg de xilazina por animal.

3.2 Cepas de *Streptococcus pneumoniae* e condições de crescimento.

As cepas de pneumococo utilizadas neste trabalho estão listadas na Tabela 1.

As bactérias foram mantidas em um freezer à temperatura de -80 °C e antes de cada experimento foram plaqueadas em meio ágar sangue (BioMérieux). Após incubação *overnight* a 37 °C sob condição anaeróbica, as bactérias foram transferidas para meio líquido Todd-Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura (THY) e incubadas a 37 °C até atingirem D.O._{600 nm} entre 0,4 e 0,6.

Tabela 1. Cepas de *Streptococcus pneumoniae* utilizadas

Cepas	Clado PspA	Sorotipo	Origem	Ensaio
St 540/99	3	14	IAL	Clon, IB, Comp, OPA
St 941/00	4	14	IAL	Clon, IB, Comp
St M10	3	3	UFG	Lig, IB, Comp, OPA
St P46	4	6B	UFG	Lig, IB
St P100	2	23F	UFG	IB
St P101	4	19F	UFG	Clon, IB, Comp
St P120	3	9N	UFG	Clon, Lig, IB, Comp, OPA

St P255	5	6A	UFG	Clon, Lig, IB, Comp, OPA
St P490	4	14	UFG	Clon, IB, Comp, OPA
St P865	5	23F	UFG	Clon, Lig, IB, Comp, OPA
St P891	3	6A	UFG	Clon, IB, Comp
St P1140	4	14	UFG	Lig, IB, Comp,
St P1153	3	9V	UFG	Clon, IB,
St D39	2	2	UAB	Lig
St A66.1	2	3	UAB	Lig, OPA, Des
St RM200*	2	–	BCH	Lig, OPA
St 0603	1	6B	BCH	Lig, OPA, Des, Bio
St 245/00	1	14	ATCC	Lig, OPA
St ATCC6303	5	3	IAL	Lig, OPA, Des
St WU2	2	3	BCH	Lig, OPA,
St Tigr4	3	4	UAB	Lig, OPA
St P47	1	6B	UFG	Lig
St P69	1	10A	UFG	Lig
St JY119	-	3	UAB	Lig
St JY182	-	3	UAB	Lig

IAL: Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.

UFG: Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil.

UAB: University of Alabama at Birmingham, USA.

BCH: Boston Children's Hospital, EUA

ATCC: American Type Culture Collection, USA

Clon: Clonagem do fragmento gênico da PspA ou PotD.

Lig: Ligação de anticorpo

IB: Immunoblotting

Comp: Ensaio de deposição de complemento

OPA: Ensaio de Opsonofagocitose

Des: Ensaio de desafio

Bio: Ensaio de formação de biofilme

* mutante negativo para autolisina e pneumolisina que não produz cápsula.

3.3 Caracterização da resposta imune induzida pela proteína PotD

A primeira parte deste projeto consistiu na validação da proteína PotD como antígeno vacinal, através de sua capacidade de induzir respostas imunes específicas. As

etapas seguintes descrevem a produção de PotD recombinante e avaliação da resposta imune conferida por esta proteína.

3.3.1 Produção da proteína PotD recombinante

3.3.1.1 Amplificação e clonagem

O gene *potD* (número de acesso no NCBI: ABJ54572) foi amplificado por PCR (SAMBROOK, 2012), a partir do isolado de pneumococo St 540/99 (Tabela 1), utilizando os seguintes oligonucleotídeos: PotD F1: 5' CAT ATG TTA GAT AGT AAA ATC AAT AGT CGA G 3'; PotD R1: 5' CTC GAG AAG CTT CCG ATA CAT TTT AAA CTG 3'. A reação foi montada da seguinte forma: 10 µL de tampão 5X Green GoTaq® Flexi Buffer, 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer*, 1,25 U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega) e 2 µg de DNA *template*.

A amplificação do gene foi realizada em termociclador (Applied Biosystems®), nas seguintes condições: denaturação inicial a 94 °C por 2 min; 30 ciclos de denaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos *primers* a 56 °C por 50 s e extensão das novas fitas de DNA a 72 °C por 1 min; extensão final a 72 °C por 10 min. Ao término da reação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para avaliação da presença do gene. A banda de DNA com tamanho correspondente ao esperado foi recortada do gel, purificada com auxílio do Kit GFX (GE HealthCare) e ligada ao vetor pGEM T-easy (Promega) pela enzima T4 DNA ligase (Life Technologies), conforme especificações do fabricante. Cinco microlitros da reação de ligação (correspondendo a aproximadamente 300 ng de DNA) foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5-α (Invitrogen) quimiocompetentes, seguido pelo plaqueamento em meio Luria-Bertani (LB) contendo 100 µg/mL de ampicilina (LB-Amp) e 1 mM de X-Gal (este reagente permite a seleção das bactérias transformadas com o vetor contendo o inserto, o que ocasiona o rompimento do gene da beta-galactosidase presente no pGEMT-easy, e leva à obtenção de colônias incolores). Após 16 h de incubação a 37 °C, colônias incolores foram selecionadas e cultivadas em caldo LB-Amp durante 16 h a 37 °C, e foi realizada a minipreparação dos plasmídeos, com auxílio do Kit Mini Plasmid Prep (GE HealthCare). O gene *potD* e foi então excisado do vetor com as endonucleases *SacI* e *XhoI* separado por eletroforese em gel de agarose (1%), purificado por GFXe inserido no vetor de expressão pET28a, previamente digerido com as mesmas endonucleases (*SacI* e *XhoI*). O vetor resultante,

pET28a *potD*, foi multiplicado em *E. coli* DH5- α , purificado e armazenado a -20 °C, finalizando a etapa de clonagem.

3.3.1.2 Expressão

A expressão de *potD* foi realizada em *E. coli* BL21DE3 (ThermoFisher) quimiocompetente. A preparação da competência, ligação e transformação foram realizadas conforme descrito por Sambrook (SAMBROOK, 2012). A seleção de transformantes foi realizada em meio Luria-Bertani (LB) contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina (LB-Amp.) após incubação a 37 °C *overnight*. Estoques de 50 μL de bactérias competentes foram descongelados e transformados com 500 ng do vetor pET28a *potD*. Após a transformação, uma colônia de *E. coli* foi inoculada em 20 mL de meio LB- Amp e incubada sob agitação no *shaker* Gyromax™ 737R (Amerex Instruments, inc) a 37 °C, 200 rpm *overnight*. No dia seguinte, o inóculo foi transferido para um erlenmeyer contendo 400 mL de meio LB-Amp e cultivado a 37 °C sob agitação até a fase *mid log* ($\text{D.O}_{600\text{ nm}}$ 0.6-0.8). A indução da expressão foi realizada pela adição de 1 mM de IPTG no cultivo e mantida por 4 h. Amostras de 1 mL dos cultivos antes e após a indução foram analisadas por SDS-PAGE para confirmação da presença da proteína recombinante.

3.3.1.3 Purificação

Após o período de indução, as culturas foram centrifugadas a 1700 x g durante 10 min à temperatura de 4 °C; os *pellets* foram ressuspensos em tampão de lise (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 5 mM Imidazol) na proporção 1:10 e lisados no aparelho sonicador (3 ciclos de 10 min a 60 hertz com pulsos de 1 s de duração). Após nova centrifugação, as proteínas recombinantes contidas no sobrenadante foram purificadas por cromatografia de afinidade ao Ni^{+2} - HisTrap HP (GE HealthCare), com auxílio do aparelho Äkta Prime (GE HealthCare) e eluídas com 300 mM de Imidazol. Após a eluição, as frações foram analisadas por SDS-PAGE e as amostras positivas foram reunidas e dialisadas contra tampão fosfato (5,3 mM NaH_2PO_4 , 15,4 mM Na_2HPO_4).

Após a diálise das frações contendo a proteínas recombinantes, foi realizada nova purificação, desta vez em uma coluna de troca iônica HiTrap™ Q HP (GE HealthCare). Novamente foi utilizado o aparelho Äkta Prime (GE HealthCare) e as frações eluídas foram analisadas por SDS-PAGE; por fim, as amostras positivas foram dialisadas contra tampão fosfato.

Com a finalidade de remover o lipopolissacarídeo (LPS) residual decorrente da produção da proteína em *E. coli*, uma etapa de lavagem da proteína rPotD foi realizada. Esta lavagem consistiu na incubação de 1 mL da proteína recombinante purificada com 10 µL de TritonX[®]-114 por 30 min a 4 °C; em seguida, as amostras foram transferidas para um banho a 37 °C, onde permaneceram por 10 min. Após centrifugação a 10.600 x g por 10 min a 25 °C, o sobrenadante contendo as proteínas foi removido e transferido para um tubo estéril. Essa sequência de lavagens foi repetida por mais 2 vezes. Após as três lavagens, as amostras contendo a proteína recombinante foram quantificadas pelo método de Bradford (Protein Assay Kit BioRad) e armazenadas a -20 °C (LIU et al., 1997).

3.3.2 Análise da resposta imune induzida pela proteína rPotD

3.3.2.1 Análise da produção de anticorpos anti-rPotD

A presença de anticorpos específicos no soro dos animais imunizados foi avaliada por ELISA. Placas MaxiSorb foram sensibilizadas com rPotD (1 µg/mL) e mantidas por 18 h em geladeira; após o bloqueio realizado com 10% de leite desnatado por 30 min, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS + 0,05% de Tween[®] 20) e incubadas por 1 h com diluições seriadas (com início em 1:150) do soro dos animais imunizados, seguido de nova lavagem e pela incubação por mais 1 h com anticorpo “*goat anti-mouse IgG*” (Sigma) na concentração de 1:10.000. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com anticorpo “*horseradish peroxidase -conjugated rabbit anti-goat IgG*” (Sigma) na concentração de 1:20.000 por 1 h, seguida de nova lavagem. A reação colorimétrica foi promovida pela adição de uma solução substrato contendo 0,5 mg/mL OPD, 0,0015% de H₂O₂ em 0,1 M de tampão ácido cítrico/citrato de sódio. A reação foi então bloqueada pela adição de 50 µL/poço de H₂SO₄ 4 N. A concentração de anticorpos foi determinada pela utilização de uma curva padrão de IgG e a leitura se deu por leitor de ELISA com filtro para 492 nm (FERREIRA et al., 2008).

3.3.2.2 Produção de óxido nítrico induzido pela administração de rPotD

Para análise *in vitro* da produção de óxido nítrico induzido pela imunização com rPotD, células foram removidas através da lavagem da cavidade peritoneal dos animais imunizados com tampão PBS.

Os lavados contendo as células peritoneais foram ajustados para a concentração de 2×10^6 células/mL em PBS. As células foram centrifugadas a 153 x g, por 10 min a 4 °C e

o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina G, 100 U/mL de sulfato de estreptomicina e 250 ng/mL de polimixina B. Aliquotas de 100 µL foram distribuídas em placas de cultura de tecidos de 96 poços (Corning Glass Works, Corning) e cultivadas durante 48 h a 37 °C e 5% de CO₂ na presença do estímulo rPotD (5 µg/mL) e solução salina (controle negativo – sem estímulo).

Após as 48 h o sobrenadante foi separado e 50 µL foram aplicados em outra placa de 96 poços de fundo chato; em seguida foram adicionados 50 µL do reagente de Griess (sulfanilamida 1%; nefitilenodiamida 0,1%; H₃PO₄ 2,5%). Diluições de uma solução estoque 10 mM de NaNO₂ foram utilizadas para gerar a curva padrão. A placa foi então incubada em temperatura ambiente por 10 min e a leitura se deu por leitor de ELISA utilizando filtro de 550 nm

3.3.2.3 Produção de citocinas no baço dos animais imunizados

A produção de citocinas pelas células do baço dos animais imunizados com foi avaliada por BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit (BD biosciences) e por ELISA, para tanto foram utilizados os kits específicos para a detecção das seguintes citocinas: interferon gama, interleucina 2 (como marcadores de respostas do tipo Th1); interleucina 4 e interleucina 5 (como marcadores de resposta do tipo Th2), essas 4 citocinas foram detectadas pelo kit CBA, e interleucina 17 (uma citocina importante na resposta inflamatória a bactérias extracelulares, como o pneumococo e marcador de resposta tipo Th17) (R&D Systems). Para a determinação de citocinas IFN-γ e IL-4 para o sobrenadante dos animais imunizados com o híbrido rPotD-PdT foi utilizado o kit de ELISA da marca Peprotech.

Após a eutanásia, o baço de cada animal foi removido e processado individualmente, utilizando-se um macerador de tecidos (Pyrex), em meio RPMI-1640 (Gibco). O homogenado foi então centrifugado 450 x g por 10 min, e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi então incubado com 1 mL de água destilada durante 10 s, para que as hemácias presentes fossem lisadas; seguiu-se a adição de 10 mL de RPMI-1640 e nova centrifugação. O pellet celular foi então ressuspensionado em 1 mL de RPMI-1640, e a viabilidade celular analisada por contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se azul de tripan. A cultura celular foi realizada em placas de 96 poços (Corning Glass Works, Corning, NY), utilizando-se 1 x 10⁶ células/poço em 100 µL de meio RPMI-1640

suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, São Paulo SP, Brasil), 100 U/mL de penicilina G e 100 U/mL de sulfato de estreptomicina e 250 ng/mL de polimixina B. O estímulo das culturas deu-se com a proteína recombinante rPotD (5 µg/mL) ou solução salina, utilizada como controle negativo. As culturas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 h e o sobrenadante coletado para determinar a secreção de citocinas por CBA e ELISA segundo o protocolo descrito pelos fabricantes.

3.3.2.4 Ligação de anticorpos anti-rPotD à superfície de pneumococos

Uma vez constatada a capacidade de rPotD em induzir a produção de anticorpos específicos (por ELISA), foi avaliada a habilidade destes anticorpos em reconhecer e se ligar à superfície de pneumococos, por citometria de fluxo. Para tanto, a cepa St 0603 foi plaqueada em meio ágar sangue, e incubada em condição de anaerobiose *overnight* a 37 °C. Na manhã seguinte, as colônias foram passadas para 10 mL de meio líquido THY e cultivadas nas mesmas condições até atingirem D.O_{600 nm} entre 0,4 - 0,5. As culturas foram centrifugadas (1700 x g, 5 min), lavadas no mesmo volume de PBS, e alíquotas de 45 µL dessa solução foram incubados na presença de 5 µL do soro de animais imunizados com rPotD (grupo experimental) ou soro de animais injetados apenas com hidróxido de alumínio em salina foi (controle), a 37 °C durante 30 min.

Após este período, as amostras foram lavadas e ressuspensas no mesmo volume de PBS, e as bactérias foram incubadas na presença de anticorpos anti-mouse IgG conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-*conjugated goat antiserum anti mouse*, MP Biomedicals), na diluição de 1:1000 durante 30 min no gelo e na ausência de luz. Após duas novas lavagens com PBS, as amostras foram fixadas em PBS contendo 1% de para-formaldeído e armazenadas a 4 °C no escuro até a leitura da fluorescência em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) (GOULART et al., 2011; SHAH et al., 2006). A análise dos dados foi realizada com o auxílio do programa Flow Jo.

3.3.2.5 Ensaio opsonofagocítico na presença dos anticorpos gerados pela imunização com a proteína rPotD

Depois de constatada a capacidade dos anticorpos de se ligar à superfície de pneumococos, foi investigada sua habilidade em mediar a opsonofagocitose da bactéria por fagócitos murinos *in vitro*. Para a coleta das células fagocíticas, camundongos BALB/c não imunizados foram estimulados por via intraperitoneal com 10 µg de concanavalina A

(ConA) e sacrificados após 48 h. A cavidade peritoneal foi lavada com 5 mL de PBS, com auxílio de uma seringa. As células peritoneais (fagócitos) foram mantidas em gelo até o uso (GOULART et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 1992).

A cepa St 0603 foi cultivada conforme descrito anteriormente. Após atingir em meio líquido THY D.O_{600 nm} entre 0.4 e 0.5, as bactérias foram centrifugadas (1700 x g por 5 min), lavadas com PBS e ressuspensas em tampão de opsonização (solução-tampão salina de Hank adicionado de 0,1% de gelatina) (S ROMERO-STEINER et al., 1997). Alíquotas das bactérias em tampão de opsonização contendo aproximadamente $2,5 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias (UFC) foram incubadas com o soro anti-rPotD ou soro de animais controle na concentração de 1:50 a 37 °C por 30 min; os soros passaram por uma incubação prévia a 56 °C por 30 min para a inativação do sistema complemento.

Após este período, as amostras foram centrifugadas, lavadas com PBS e incubadas com 10% de soro normal de camundongo (fonte de complemento) em tampão de opsonização a 37 °C por 30 min. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS e incubadas no *shaker* com 4×10^5 células peritoneais murinas diluídas em tampão de opsonização a 37 °C e 250 rpm por 45 min. A reação foi bloqueada por incubação em gelo por 5 min. As amostras foram submetidas a diluições seriadas, plaqueadas em ágar sangue e o número de UFC recuperadas contadas após 18 h (GOULART et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 1992).

O resultado foi expresso em gráfico de barra, onde o número das UFC recuperadas foi comparado àquele obtido no grupo controle (contendo fagócitos e pneumococos na presença de soro inespecífico) (GOULART et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 1992).

3.4 Construção e avaliação imune das proteínas híbridas rPotD-PdT e rPspA-PotD.

Após a validação do potencial imunogênico de rPotD, foi analisada a resposta imune induzida pela fusão desta molécula com dois outros antígenos de pneumococo: PspA e PLY. As etapas seguintes descrevem a obtenção e caracterização imunológicas destas vacinas híbridas.

3.4.1 Seleção de uma molécula de PspA de família 2 para fusão com PotD

Devido à variabilidade sorológica de PspA, foi realizado um estudo a fim de selecionar a molécula de família 2 capaz de induzir anticorpos com maior reatividade cruzada.

Para tanto, as sequências nucleotídicas correspondentes à região N-terminal de 8 isolados de pneumococo que expressam PspA de família 2 (Tabela 1) foram amplificadas por PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos PspA_SacI_F: 5' GAG CTC GAA GCG CCC GTA GCT AGT 3' e PspA_HindIII_R: 5' AA GCT TGT CGA CCC ACA TAC CGT TTT CTT GTT TCC 3'. As condições da reação foram as mesmas descritas no item 3.3.1. Os genes foram clonados em vetor pGEMT-easy de forma semelhante à descrita para potD, digeridos com as endonucleases *SacI* e *HindIII*, e subclonados em vetor pAE-6xHis (RAMOS et al., 2004) previamente digerido com as mesmas enzimas. As proteínas recombinantes foram produzidas conforme descrito para PotD e utilizadas na imunização subcutânea de camundongos em 3 doses de 5 µg, utilizando Alum como adjuvante, em intervalos de 15 dias. Os soros, coletados após a última imunização conforme descrito no item 3.3.1, foram utilizados na avaliação da reatividade cruzada, conforme se segue:

3.4.1.1 Avaliação da reatividade dos anticorpos por immunoblot

A seleção da molécula de PspA com maior reatividade cruzada foi iniciada a partir da análise por *immunoblotting*. Os isolados de *S. pneumoniae*: St 540/99, St 941/00, St P120, St M10, St P255, St P1153, St P46, St P865, St P490, St P101, St P891 e St P100, foram plaqueados em ágar sangue e incubados *overnight* a 37 °C. Na manhã seguinte, os cultivos foram inoculados em 15 mL de meio líquido (THY) e incubados novamente a 37 °C até atingirem D.O._{600 nm} entre 0,4 e 0,6. As bactérias foram centrifugadas a 2880 x g durante 10 min. Os pellets foram lavados três vezes com PBS e então sonicados em 2 ciclos de 10 min a 60 Hz com pulsos de 1 s de duração. Foram novamente centrifugados e o sobrenadante foi retirado, quantificado pelo método de Bradford e armazenado a -20 °C.

Amostras contendo 5 µg do extrato de pneumococos previamente mencionados, foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (120 mA, 90 min). Após bloqueio realizado com 10% de leite desnatado por 18 h, as membranas foram incubadas com soros anti-rPspA na diluição 1:1000 durante 2 h, lavadas com tampão TBS-T (100 mM Tris, 150 mM NaCl e 0,05% Tween® 20) e incubadas com anticorpo secundário “*horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG*” (Sigma) na diluição de 1:1000 durante 1 h. Após nova lavagem, a detecção foi realizada utilizando-se o Kit Immobilon Western (Millipore).

3.4.1.2 Ligação dos anticorpos contra diferentes rPspAs à superfície de pneumococos.

Após a seleção por *immunoblotting* descrita acima, os 4 soros que reagiram reconhecendo o maior número de bactérias, foram escolhidos para esta etapa da seleção.

O protocolo utilizado foi o mesmo descrito no item 3.3.2. Para esta etapa foram utilizados os isolados: St 540/99, St 941/00, St P120, St M10, St P255, St P1153, St P46, St P865, St P490, St P101, St P891. E os soros dos animais imunizados com as rPspAs escolhidas foram comparados com o soro dos animais controle.

3.4.1.3 Ensaio opsonofagocítico na presença dos anticorpos gerados pelas imunizações.

Após a análise dos resultados obtidos pelo ensaio de ligação, os 3 soros mais imunorreativos foram utilizados para a seleção pelo ensaio de opsonofagocitose *in vitro*. O procedimento foi o mesmo utilizado na primeira etapa e está descrito do item 3.3.2; a única diferença foi o fato de que foram utilizadas neste ensaio as cepas St 540/99, St M10, St P490, St P1140, St P255 e St P865.

A análise dos resultados obtidos por todos os experimentos descritos acima possibilitou a escolha de uma molécula de PspA com alta reatividade cruzada dentro da família 2. Essa proteína, a PspA produzida a partir da cepa St P490, foi utilizada para a construção da proteína híbrida PspA-PotD.

3.4.2 Construção das fusões rPspA-PotD e rPotD-PdT

As proteínas híbridas foram obtidas a partir da fusão dos genes no vetor pET28a, através de ligações sequenciais. Para a montagem do híbrido *pspA-potD*, o fragmento gênico de *pspA* foi excisado do vetor pGEMT-easy pela digestão com as enzimas *SacI* e *HindIII*, purificado e ligado ao vetor pET28a-*potD* (item 3.3.1) digerido com as mesmas enzimas, originando o vetor pET28a *pspA-potD*.

O híbrido *potD-pdT* foi gerado pela fusão do gene *potD* ao gene *pdT*, que codifica uma forma detoxificada da proteína pneumolisina. O gene *pdT* foi inicialmente amplificado a partir do vetor pQE-*pdT* (cedido pela Dra Cibelly Goulart), utilizando os oligonucleotídeos: PdT F1: 5' AAG CTT ATG GCA AAT AAA GCA GTA A 3'; e PdT R1: 5' CTC GAG CTA ATC ATT TTC TAC CTT ATC C 3'. O fragmento resultante foi purificado e ligado ao vetor pGEMT-easy conforme descrito no item 3.3.1. O vetor resultante, pGEMT-easy-*pdT*, foi digerido com as endonucleases *XhoI* e *HindIII*, e o

fragmento correspondente ao gene *pdT*, purificado e ligado ao vetor *pET28a-potD* previamente aberto com as mesmas enzimas, dando origem ao vetor *pET28a potD-pdT*. As construções tiveram a sua sequência confirmada pela técnica de sequenciamento.

3.4.3 Produção das proteínas recombinantes em *E. coli*.

Os híbridos *rPspA-PotD* e *rPotD-PdT* foram produzidos em cepas de *E. coli* BL21DE3 quimiocompetentes, seguindo o protocolo descrito no item 3.3.1. A presença das proteínas na fração solúvel foi confirmada por SDS-PAGE, através da comparação com os cultivos bacterianos antes da indução.

As proteínas *PotD*, *PspA* e *PdT* isoladas também foram produzidas; *PotD* e *PspA* foram expressas conforme descrito no item 3.3.1, enquanto *PdT* foi obtida a partir de cepas de *E. coli* M15 transformadas com o vetor *pQE-pdT*. Neste caso, os clones positivos foram selecionados e cultivados em LB-Kan-Amp.

Todas as proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel, seguida por cromatografia de troca iônica, conforme descrito para *PotD* (item 3.3.1). As frações eluídas foram dialisadas, despirogenizadas e quantificadas pela técnica de Bradford.

3.4.4 Análise da resposta imune induzida pela administração dos híbridos *rPotD-PdT* e *rPspA-PotD*

3.4.4.1. Imunização e análise da produção de anticorpos específicos

Para a avaliação da resposta imune induzida pelas proteínas híbridas, camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 5 e 7 semanas foram divididos em grupos (com cinco animais cada) conforme o antígeno utilizado: *PotD* isolada: 8,4 µg de *rPotD*; *PdT* isolada: 11,6 µg de *rPdT*; *rPotD* e *rPdT* coadministradas: 8,4 µg de *rPotD* e 11,6 µg de *rPdT* combinadas; e híbrido: 20 µg da proteína *rPotD-PdT*.

Para os experimentos utilizando o outro híbrido (*rPspA-PotD*) os grupos, também de 5 animais, foram os seguintes: *PotD* isolada: 12 µg de *rPotD*; *PspA* isolada: 10 µg de *rPspA*; e híbrido: 22 µg da proteína *rPspA-PotD*.

Os animais foram imunizados pela via subcutânea, com a adição de 100 µg de hidróxido de alumínio como adjuvante, em um volume total de 200 µL por animal por dose. Um grupo controle recebeu hidróxido de alumínio em salina. As doses foram administradas seguindo o esquema de 3 doses com 14 dias de intervalo.

O sangue dos animais imunizados foi coletado por punção retro-orbital 14 dias após a última imunização, e a presença de anticorpos específicos contra rPotD, rPdT e rPspA foi determinada nos soros por ELISA como descrito no item: **3.3.2**, sendo que para a sensibilização da placa foram utilizadas as proteínas rPotD, rPdT ou rPspA.

3.4.4.2 Reconhecimento das proteínas híbridas rPotD-PdT e rPspA-PotD por anticorpos anti-rPotD, anti-rPdT e anti-rPspA

A fim de confirmar os resultados do ELISA, foi avaliado o reconhecimento das proteínas híbridas rPotD-PdT e rPspA-PotD por anticorpos contra as proteínas isoladas, rPotD e rPdT ou rPotD e rPspA, através da técnica de *immunoblotting*. Após a quantificação, 300 ng de cada proteína foram aplicados em gel de poliacrilamida 10%, em seguida transferidos para membrana de nitrocelulose (120 mA, 90 min). Após bloqueio com 10% de leite desnatado, as membranas foram incubadas com os soros ([anti-rPotD ou anti-rPdT] ou [anti-rPotD ou anti-rPspA]) na diluição 1:2.000 durante 2 h, lavadas com tampão TBS-T (100 mM Tris, 150 mM NaCl e 0,05% Tween[®] 20) e incubadas com anticorpo secundário “*horseradish peroxidase -conjugated goat anti-mouse IgG*” (Sigma) na diluição de 1:3.000 durante 1 h. Após nova lavagem, a detecção foi realizada utilizando-se o Kit Immobilon Western (Millipore).

3.4.4.3 Produção de óxido nítrico pelas células peritoneais dos animais imunizados

Após a avaliação da resposta imune humoral (através do ensaio de ELISA) induzida pelas formulações vacinais, passou-se à análise de resposta celular. Inicialmente avaliamos a produção de óxido nítrico nas culturas das células peritoneais dos animais imunizados.

Para análise *in vitro* da produção de óxido nítrico, as células peritoneais foram removidas através da lavagem da cavidade peritoneal dos animais com tampão PBS e cultivadas na presença ou ausência do estímulo com rPotD, rPdT ou rPspA. A avaliação se deu conforme descrito no item **3.3.2**.

3.4.4.4 Produção de citocinas no baço dos animais imunizados

A produção de citocinas pelas células do baço dos animais imunizados foi avaliada por ELISA (nos grupos imunizados com o híbrido rPotD-PdT, suas proteínas isoladas e coadministradas) ou citometria de fluxo (para os animais imunizados com a fusão rPspA-PotD e seus controles). Na análise por ELISA, foram avaliadas as citocinas IFN- γ , IL-4 e

IL-17a (Peprotech) e IL-17 total (RD Systems). Para a avaliação por citometria de fluxo, utilizou-se o BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit (BD Bioscience) que detecta as citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5.

Após a eutanásia, o baço de cada animal foi removido e processado individualmente, utilizando-se um macerador de tecidos (Pyrex), em meio RPMI-1640 (Gibco). O macerado foi então centrifugado 450 x g por 10 min, e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi então incubado com 1 mL de água destilada durante 10 s, para que as hemácias presentes fossem lisadas; seguiu-se a adição de 10 mL de RPMI-1640 e nova centrifugação. O pellet celular foi então ressuspensionado em 1 mL de RPMI-1640, e a viabilidade celular analisada por contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se azul de tripan. A cultura celular foi realizada em placas de 96 poços (Corning Glass Works, Corning, NY), utilizando-se 1×10^6 células/poço em 100 μ L de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotecnologia, São Paulo SP, Brasil), 100 U/mL de penicilina G e 100 U/mL de sulfato de estreptomicina e 250 ng/mL de polimixina B. O estímulo das culturas deu-se com as proteínas recombinantes rPotD (5 μ g/mL), rPdT (5 μ g/mL) e rPspA (5 μ g/mL), solução salina foi utilizada como controle negativo. As culturas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 48 h e o sobrenadante coletado para determinar a secreção de citocinas por ELISA ou CBA, conforme protocolos descritos pelos fabricantes.

3.4.4.5 Ligação dos anticorpos à superfície de pneumococos.

Uma vez confirmado que a imunização de camundongos com as proteínas selecionadas induz a produção de anticorpos capazes de reconhecer cada proteína isoladamente, foi avaliada a capacidade destes anticorpos de reconhecerem as proteínas presentes na superfície de pneumococos intactos. Para este ensaio foi utilizada a mesma metodologia descrita no item 3.3.2. Para o ensaio utilizando o soro dos animais imunizados com o híbrido rPotD-PdT foram utilizados os pneumococos St RM200, St A66.1, St M10, St 0603, 245/00 e St ATCC6303. Para o ensaio utilizando o soro dos animais imunizados com o híbrido rPspA-PotD foram utilizadas as bactérias: St 245/00, St P69, St P47, St D39, St WU2, St A66.1, St 0603, St M10, St 245/00, St ATCC6303.

3.4.4.6 Ensaio opsonofagocítico

Após a confirmação de que os anticorpos gerados pelas imunizações são capazes de reconhecer e se ligarem a superfície das bactérias testadas, partimos para a avaliação da opsonofagocitose *in vitro*. A metodologia utilizada foi a mesma descrita no item 3.3.2.

Nesta etapa foram utilizadas as mesmas bactérias do ensaio de ligação; para o híbrido rPotD-PdT foram utilizados os pneumococos St RM200, St A66.1, St M10, St 0603, St 245/00 e St ATCC6303; para o ensaio utilizando o soro dos animais imunizados com o híbrido rPspA-PotD foram utilizadas as bactérias: St 0603, St A66.1, St WU2, St Tigr4, St P490 e St ATCC6303.

3.5 Avaliação da proteção conferida pelas vacinas

A proteção induzida pelas proteínas foi avaliada através de dois modelos de infecção pneumocócica em camundongos: colonização nasal e sepse. No modelo de colonização nasal, foi utilizado um isolado não virulento de *Streptococcus pneumoniae*, e a proteção foi associada à redução na contagem bacteriana na cavidade nasal dos camundongos, comparando-se os grupos imunizados ao controle (injetado apenas com adjuvante em salina). Para o desafio de sepse, foi utilizada uma cepa virulenta de pneumococo que, após injetada pela narina dos animais, infecta os pulmões e a corrente sanguínea, levando à morte. Neste caso, a proteção foi avaliada comparando-se os animais sobreviventes ao desafio nos grupos imunizados com o grupo controle. Além das vacinas híbridas, também foi avaliada a proteção conferida pelas proteínas PspA, PotD e PdT isoladas e combinadas. As etapas seguintes descrevem os ensaios de proteção.

3.5.1 Ensaio de desafio intranasal de colonização

Para o desafio de colonização, foi utilizado o protocolo descrito por Malley e colaboradores (MALLEY et al., 2001). *S. pneumoniae* cepa St 0603 (sorotipo 6B) foi cultivada em meio THY até atingir D.O._{600 nm} entre 0.4 e 0.5, aliquotada em THY adicionado de 15% de glicerol, e mantida em freezer a -80 °C. No dia do desafio, o estoque bacteriano foi descongelado, e diluído a uma concentração final de 1×10^7 UFC em volume de 10 µL de PBS estéril/animal. Esta suspensão foi inoculada na narina de cada camundongo imunizado com as proteínas purificadas ou apenas injetado com adjuvante em salina (controle). Para este ensaio foram utilizados 10 animais por grupo.

Após 7 dias, os animais foram eutanasiados, a traqueia foi exposta e seccionada, e o lavado do sistema respiratório superior (lavado nasal) foi coletado pela injeção, através da traqueia seccionada, de solução salina estéril gelada. As primeiras 6 gotas foram coletadas pelas narinas do animal. Este lavado foi diluído e plaqueado em placas de ágar sangue contendo 2,5 mg/mL de gentamicina; as placas foram incubadas por um período de 18 h em anaerobiose a 37 °C. Após a incubação foi realizada a contagem da UFC recuperadas. O resultado foi expresso em gráfico onde cada ponto corresponde ao número de UFC recuperada para cada animal. A análise estatística foi realizada por Test t de Student, onde cada grupo imunizado foi comparado com o grupo controle.

3.5.2 Ensaio de desafio intranasal de sepse

O desafio letal por sepse foi realizado como descrito por Ferreira *et al* (FERREIRA et al., 2009). *S. pneumoniae* St ATCC6303 e St A66.1 foram cultivadas em meio THY até atingirem D.O._{600 nm} entre 0,4 e 0,5, aliquotadas com meio THY adicionado de 15% glicerol, e mantidas em freezer a -80 °C. Uma suspensão contendo $3,6 \times 10^4$ de St ATCC6303 ou 1×10^4 de St A66.1 em 50 µL de PBS estéril foi inoculada na narina dos camundongos previamente anestesiados por via intraperitoneal com 200 µL de uma mistura contendo 1 µg quetamina e 0,625 µg xilasina. Os camundongos foram observados durante 21 dias, e o número de animais sobreviventes foi calculado para cada grupo. A análise estatística da sobrevivência por realizada por ANOVA, com pós-teste de Tuckey. Ao término do experimento, todos os animais que sobreviveram foram eutanasiados.

3.6 Avaliação da influência de PotD sobre a formação de biofilme por *Streptococcus pneumoniae*

A última etapa deste trabalho consistiu na avaliação do papel da proteína PotD e das poliaminas na formação de biofilmes por pneumococo. Devido ao papel do biofilme na colonização da nasofaringe, a formação de biofilme *in vivo* foi avaliada em modelo de colonização nasal. Os itens a seguir descrevem a influência das poliaminas na formação de biofilme em placa, e o papel de PotD na formação de biofilme nasal.

3.6.1 Quantificação da formação de biofilme *in vitro*.

A formação de biofilme por *Streptococcus pneumoniae* foi avaliada através de um ensaio de adesão em microplaca de 96 poços, utilizando uma adaptação do protocolo

descrito por Yadav e cols (YADAV; CHAE; SONG, 2012). O isolado St 0603 foi plaqueado em meio ágar sangue e incubado *overnight* em condição de anaerobiose a 37 °C. No dia seguinte, as bactérias foram diluídas em meio THY até D.O._{600 nm} de 0,05. A suspensão foi novamente incubada a 37 °C em anaerobiose até a cultura atingir D.O._{600 nm} entre 0,2 e 0,3; neste momento, foi adicionado glicerol em uma concentração final de 10% (vol/vol), e a suspensão foi mantida em freezer -80 °C até o uso.

A fim de investigar o papel das poliaminas da formação de biofilme *in vitro*, placas de poliestireno estéreis de 96 poços (Thermo, Fisher Scientific) foram incubadas com 200 µL de TSB (Tryptona e Soytona Broth) onde foi adicionado o inóculo bacteriano na proporção de 1:10, acrescido de solução de espermidina (Sigma) ou putrescina (Sigma) nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mM. As placas foram incubadas a 37 °C em anaerobiose pelos tempos de 6, 8 e 10 h (SHAK et al., 2013).

Após as incubações nos diferentes tempos, o meio foi removido e as placas foram lavadas com PBS por 3 vezes e mantidas em temperatura ambiente por 3 h para secagem. Em seguida, cada poço foi adicionado de 50 µL de solução 0,01% de cristal violeta e incubado por 15 min. O excesso de corante foi decantado e as placas foram lavadas 3 vezes com água destilada estéril. O cristal violeta que aderiu às bactérias foi dissolvido em 200 µL de etanol 95% e a densidade ótica foi medida a 570 nm. O experimento foi realizado em triplicata e a média foi calculada e utilizada para as análises. Como branco foi considerado o valor da absorbância dos poços onde apenas o meio foi adicionado e incubado com cristal violeta (YADAV; CHAE; SONG, 2012).

O cálculo final da absorbância das amostras foi realizado descontando-se o valor do branco, e comparado à amostra incubada em meio de cultura na ausência de poliaminas (amostra-controle, que foi considerada como 100%). A porcentagem para os outros tratamentos foi calculada a partir da amostra-controle.

3.7 Análise estatística

Para os ensaios de quantificação de IgG total e citocinas por ELISA, produção de óxido nítrico, ensaio de ligação e opsonofagocitose, foi utilizado o teste t de Student para a comparação entre um grupo imunizado e o grupo controle e/ou o teste ANOVA one way seguindo do teste Tukey para a comparação entre todos os grupos. Para a análise da formação de biofilme *in vitro* foi realizado teste ANOVA two ways com Bonferroni como

pós teste sendo que cada tratamento foi comparado com o meio TSB sem adição de poliaminas.

4 Resultados

4.1 Análise da resposta imune induzida pelas imunizações com a proteína rPotD

4.1.1 Produção e purificação da proteína rPotD

O gene *potD* foi obtido a partir da cepa St 540/99 e a proteína recombinante PotD foi produzida pela cepa *E. coli* BL21DE3, e purificada a partir da fração solúvel dos lisados bacterianos, por cromatografia de afinidade ao níquel - coluna HisTrap HP - seguida de cromatografia por troca catiônica – coluna HiTrap Q HP. Pode-se observar que a proteína recombinante PotD aparece como uma banda com ≈ 44 kDa e foi produzida com poucas impurezas (Figura 5). A quantificação pelo método de Bradford revelou que a partir de um cultivo de 400 mL foi possível obter uma concentração de 6 mg/mL, em um volume de 5 mL, totalizando 30 mg de proteína recombinante.

Figura 5- Análise da proteína recombinante PotD purificada e separada por SDS-PAGE. Onde: 1- Peso Molecular; 2- rPotD (≈ 44 kDa).

4.1.2 Avaliação da resposta imune induzida pela administração da proteína recombinante PotD.

A resposta imune humoral foi avaliada nos camundongos imunizados com rPotD através da quantificação dos anticorpos induzidos no soro por ELISA. É possível observar que a proteína foi imunogênica, induzindo 65 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpos específicos, enquanto o soro dos animais injetados com o adjuvante em solução salina não apresentou reatividade (Figura 6).

Figura 6 - Quantificação de anticorpos do tipo IgG anti-rPotD. Soro dos animais imunizados com rPotD foi analisado por ELISA para a determinação da quantidade de anticorpos do tipo IgG que foram produzidos especificamente contra a proteína administrada. O resultado expresso corresponde à média de 5 animais em cada grupo. Como controle foi utilizado o soro de animais injetados apenas com hidróxido de alumínio em solução salina 0,9%. ** $p < 0,01$.

A resposta imune celular foi inicialmente avaliada pela dosagem das citocinas produzidas nos esplenócitos dos animais imunizados após o estímulo *in vitro* com a proteína rPotD. É possível observar uma maior produção de IFN- γ , IL-2, IL-5 e IL-17 nas células dos camundongos imunizados com rPotD e estimuladas *in vitro*, em comparação com o grupo controle também estimulado por rPotD (Figura 7A,B,C e D).

A produção de óxido nítrico (NO), um marcador da ativação de fagócitos, também foi avaliada nas células peritoneais dos camundongos vacinados. A imunização subcutânea com rPotD aumentou a produção de óxido nítrico pelas células peritoneais em cultura, um resultado que foi dependente do estímulo *in vitro* com rPotD (Figura 7E). Para nenhum outro grupo foi possível detectar a produção de níveis significativos de NO.

Juntos, esses resultados mostram que a imunização com rPotD foi capaz de induzir uma resposta imune sistêmica específica, com a produção de anticorpos, IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-17 e NO após o estímulo com a proteína.

Figura 7 – Resposta imune celular induzida pela administração de rPotD. Grupos de camundongos BALB/c foram imunizados com 3 doses de rPotD, 14 dias após a última imunização os esplenócitos e as células peritoneais foram coletadas e mantidas em cultura (1×10^6 células/poço) com e sem o estímulo da proteína rPotD por 48 h à 37 °C. A produção das citocinas foi avaliada no sobrenadante da cultura de células do baço: **A)** INF- γ . **B)** IL-2 **D)** IL-17 **E)** A produção de óxido nítrico foi avaliada no sobrenadante da cultura de células peritoneais. A diferença foi calculada entre os grupos experimentais e controle. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

4.1.3 Reconhecimento da bactéria e opsonofagocitose mediados por anticorpos anti-rPotD

O soro dos animais imunizados com rPotD foi avaliado quanto à habilidade de interagir com a proteína PotD nativa expressa na superfície do pneumococo, por citometria de fluxo. Verificamos que o soro de animais imunizados mostrou-se capaz de se ligar na superfície do pneumococo de forma superior ao grupo controle, sugerindo que a PotD está parcialmente exposta no pneumococo (Figura 8A).

O potencial opsonizante dos anticorpos anti-rPotD foi avaliado através de um ensaio de fagocitose *in vitro*, utilizando células peritoneais retiradas de animais não imunizados. Neste ensaio, uma redução na contagem bacteriana correlaciona-se à fagocitose dos pneumococos pelas células peritoneais. Foi observado que a incubação da cepa St 0603 com soro de camundongos imunizados com rPotD, seguida pela adição de uma fonte de complemento e das células peritoneais reduziu significativamente o número de UFC recuperadas quando comparada ao grupo controle (Figura 8B).

Em conjunto, os resultados sugerem que os anticorpos dos animais imunizados com rPotD induziram a produção de anticorpos capazes de reconhecer a PotD nativa e também favoreceram a sua fagocitose.

Figura 8 – Análise funcional dos anticorpos anti-PotD. A) Ensaio de ligação à superfície bacteriana. *S. pneumoniae* St 0603 foi incubado com o soro dos animais imunizados com rPotD ou adjuvante em salina (controle), seguido de mais uma incubação com anticorpos anti-IgG de camundongo conjugados com FITC e analisados por citometria de fluxo. A porcentagem de células positivas (Com intensidade de fluorescência superior a 10^1) foi calculada para cada amostra. B) Ensaio de opsonofagocitose. As bactérias opsonizadas com soro anti-rPotD foram incubadas na presença de fagócitos peritoneais e uma fonte de complemento, e o número de UFCs recuperadas (correspondendo às bactérias que não foram fagocitadas) contadas após 18 h. A análise estatística foi feita comparando-se os grupos imunizados com o grupo controle por teste t de Student * = $p < 0,05$.

4.1.4 Proteção conferida pela imunização com rPotD em modelo de colonização

Com a finalidade de determinar o efeito protetor da imunização sistêmica contra a colonização por pneumococo, os animais imunizados com rPotD e os do grupo controle foram inoculados por via intranasal com a bactéria St 0603; após 7 dias, o número de UFC recuperadas – que representam a quantidade de bactérias que conseguiram colonizar as vias aéreas superiores dos animais – foi determinada pelo plaqueamento do lavado nasal de cada animal. É possível observar que a imunização com a rPotD reduziu significativamente o número de UFC recuperadas quando comparado ao grupo controle, mostrando que a imunização com rPotD foi capaz de conferir proteção contra a colonização por este isolado de pneumococo (Figura 9).

St 0603 (Sorotipo 6B)

Figura 9 - Colonização da nasofaringe de camundongos após desafio intranasal. Camundongos BALB/c (10 por grupo) foram imunizados com rPotD ou adjuvante em salina (controle) e desafiados 14 dias após a última dose com 1×10^7 UFC da bactéria St 0603. O gráfico mostra a quantidade de bactérias recuperadas do lavado nasal de cada animal, 7 dias após o desafio. As barras horizontais representam a mediana obtida em cada grupo. * = $p < 0.05$ em comparação com o grupo controle.

4.2 Construção das proteínas híbridas PspA-PotD e PotD-PdT

4.2.1 Seleção de uma molécula de PspA de família 2 para fusão com PotD

4.2.1.1 Produção e purificação das diferentes PspA

Após a confirmação do potencial imunogênico e protetor da proteína rPotD, foi avaliada a resposta imune conferida por vacinas híbridas contendo PotD fusionada a dois outros antígenos de pneumococo, PspA e PdT. Devido à variabilidade estrutural e sorológica de PspA, inicialmente foi realizada uma triagem de moléculas pertencentes à

família 2, a fim de selecionar aquela com maior amplitude de reconhecimento cruzado, para inclusão na vacina híbrida.

Foram selecionadas 8 cepas de *S. pneumoniae* que expressam PspA de família 2 (clados 3, 4 e 5), para amplificação da região N-terminal das moléculas. Os fragmentos gerados foram clonados e expressos em *E. coli*, e purificados por cromatografia de afinidade ao níquel. Podemos observar na Figura 10 a análise por SDS-PAGE das proteínas purificadas. Pode-se verificar que o peso molecular das proteínas recombinantes produzidas variou entre aproximadamente 50 e 90 kDa; esse resultado deve-se primeiramente à heterogeneidade dessas proteínas que podem variar entre 42 e 95 kDa devido à presença ou não da região Non-Pro na porção C-terminal dos fragmentos (que corresponde à região rica em prolinas na proteína madura). Além disso, a presença de várias sequências repetidas na região rica em prolinas favorece o alinhamento do oligonucleotídeo reverso em diferentes posições, levando então a obtenção de proteínas com tamanhos diferentes.

Figura 10 - Análise por SDS-PAGE dos fragmentos purificados de rPspAs de família 2: 1- Peso molecular; rPspA clonada das cepas 2- St 941/00. 3- St P101; 4- St 540/99; 5- St P490; 6- St P891; 7- St P1153; 8- St P255; 9- St P865. Todos os de rPspA fragmentos incluem a região aminoterminal da molécula, e um parte da região rica em prolinas.

4.2.1.2 Avaliação da reatividade cruzada induzida por soros anti-PspAs por immunoblotting

A da avaliação da reatividade cruzada do soro induzida contra as diferentes PspAs clonadas foi realizada através de análises por *immunoblotting*. O soro de camundongos imunizados com 3 doses das rPspAs foi avaliado quanto à capacidade de reconhecer a PspA nativa, no extrato total de cinco cepas do clado 3, cinco cepas do clado 4, duas cepas do clado 5 e uma cepa do clado 2 (pertencente à família 1). Pode-se observar que os diferentes soros apresentaram padrões de reconhecimento cruzado variáveis (Figura 11, painéis “a” até “h”). Os soros anti-rPspA 941/00 (painel c), anti-P101 (painel d) e anti-

P490 (painel e) apresentaram a maior amplitude de reconhecimento cruzado, e foram selecionados para as análises seguintes.

a) Soro anti-P255

b) Soro anti-540/99

c) Soro anti-941/00

d) Soro anti-P101

e) Soro anti-P490

f) Soro anti-P865

g) Soro anti-P891

h) Soro anti-P1153

Figura 11 - Análise da reatividade cruzada de PspAs em extrato de pneumococo por anticorpos anti-rPspA de família 2. Soros de camundongos imunizados com rPspAs St P255 (painel a); St 540/99 (b); St 941/00 (c); St P101 (d); St P490 (e); St P865 (f); St P891 (g) e St P1153 (h) foram incubados por *immunoblotting* contra extratos de pneumococo contendo PspAs de família 2 (clados 3, 4 e 5, conforme indicado pelos colchetes em cada painel) e um extrato pertencente à família 1 (de clado 2). As proteínas recombinantes homólogas a cada soro também foram incluídas como controles positivos (rPspA).

4.2.1.3 Avaliação da deposição de complemento na superfície de pneumococos em presença de soro anti-rPspA

Conforme avaliação por Western blot, os 3 soros anti-rPspA mais imunorreativos (anti-P101, anti-P490 e anti-941/00) foram testados quanto à capacidade de se ligar a superfície bacteriana de diferentes isolados de pneumococo, e induzir a deposição do componente C3 do sistema complemento em sua superfície por FACS.

A deposição do complemento nos isolados de pneumococos frente aos soros testados, foi avaliada pelos valores da mediana da intensidade de fluorescência (Tabela 2). A partir dos valores de mediana e tomando o controle como referência, foi calculado o aumento relativo da deposição de complemento em cada amostra (Figura 12).

É possível observar que, para todas as bactérias testadas, com exceção das cepas St P101 e St P255, ao menos um dos soros foi capaz de aumentar em duas vezes a deposição do componente C3 na parede da bactéria. Todos os soros testados apresentaram bons resultados, induzindo uma maior deposição de C3 na superfície das bactérias quando comparados ao soro dos animais controle. Por este motivo, os 3 soros com maior abrangência foram utilizados no ensaio de opsonofagocitose.

Tabela 2 - Deposição do complemento na superfície bacteriana após incubação com os soros anti-PspAs.

Mediana da intensidade de fluorescência obtida (FITC-H)					
		Soros utilizados			
Cepas		Controle	Anti-P101	Anti-P490	Anti-941/00
Clado 3	St P120	129,54	219,46	138,91	282,40
	St 540/99	19,11	73,75	55,22	50,82
	St P891	171,84	272,25	299,28	381,10
Clado 4	St P101	9,31	17,96	14,70	18,10
	St P490	10,70	41,18	23,40	34,06
	St 941/00	10,13	82,11	67,09	50,74
	St P1140	8,20	43,58	42,68	147,79
Clado 5	St P255	56,10	104,87	78,40	43,80
	St P865	5,58	54,16	53,42	54,66

Figura 12 - Aumento relativo da deposição do componente C3 na superfície bacteriana após a incubação com os respectivos soros. São mostrados os valores relativos de deposição de complemento na superfície de 9 isolados de pneumococo expressando PspAs de família 2 (eixo x) em presença de soro de camundongos imunizados com 3 PspAs recombinantes (anti-PspA P101, anti-PspA P490 e anti-PspA 941/00). O aumento relativo foi calculado tendo como padrão a intensidade de fluorescência obtida pela incubação com o soro de animais controle

4.2.1.4 Ensaio de opsonofagocitose na presença de anticorpos anti-rPspA

Uma vez que os soros anti-rPspA (das cepas St P101, St P490 e St 941/00) foram capazes de aumentar a deposição de complemento na superfície dos isolados testados, estes três soros foram então avaliados quanto à capacidade de aumentar a fagocitose das bactérias por células peritoneais murinas na presença de uma fonte de complemento.

Os soros foram testados contra duas bactérias contendo PspAs de cada clado pertencente à família 2. Todos os soros foram capazes de favorecer a opsonofagocitose em ao menos um isolado de pneumococo (Figura 13).

O soro anti-PspA da cepa St P490 apresentou os melhores resultados, aumentado significativamente a opsonofagocitose de cinco dos seis isolados de pneumococo avaliados (St M10, St 540/99, St P490, St P1140 e St P255), incluindo todos os clados 3 e 4, somente falhando com uma cepa de clado 5. O soro anti-PspA da cepa St 941/00 induziu um aumento na fagocitose de quatro isolados (St M10, St P490, St P1140 e St P865), sendo duas contendo PspAs do próprio clado, uma de clado 3 e uma de clado 5, enquanto anti-PspA da cepa St P101 foi eficaz em aumentar a fagocitose de apenas duas cepas de pneumococo de clado homólogo (St P490 e St P255) (Tabela 3).

St M10 (Sorotipo 3, clado 3)

St 540/99 (Sorotipo 14, clado 3)

St P490 (Sorotipo 14, Clado 4)

St P1140 (Sorotipo 14, clado 4)

St P255 (Sorotipo 6A, clado 5)

St P865 (Sorotipo 23F, clado 5)

Figura 13 - Opsonofagocitose de pneumococos *in vitro* na presença de anticorpos anti-rPspAs. Os isolados de pneumococo St M10, St 540/99, St P490, St P 1140, St P255 e St P865 foram incubados na presença do soro dos animais imunizados com as PspAs recombinantes P101, P490 e 941/00 e uma fonte de complemento, em seguida foram incubados com células peritoneais de camundongos e plaqueados em ágar sangue. As UFC foram contadas após 18 h. A análise estatística foi feita comparando os grupos imunizados com o grupo controle por teste ANOVA seguido de pós teste de Tukey: *** = $p < 0.001$; ** = $p < 0.01$; * = $p < 0.05$.

Tabela 3 - Opsonofagocitose de cepas de *S. pneumoniae* contendo PspAs de diferentes clados na presença de soro de animais imunizados com as rPspAs

Cepas de <i>S. pneumoniae</i>		Soros anti-PspA		
		Anti-P101	Anti-P490	Anti-941/00
Clado 3	M10		X	X
	540/99		X	
Clado 4	P490	X	X	X
	P1140		X	X
Clado 5	P255	X	X	
	P865			X

Referente aos gráficos mostrados na Figura 13, X indica uma redução significativa na contagem de pneumococos após a incubação com os fagócitos na presença dos anticorpos específicos.

A análise de todos os resultados obtidos nesta etapa do projeto sugere que a PspA clonada a partir da cepa St P490, foi a molécula que induziu anticorpos mais imunorreativos dentre todos os fragmentos testados. Portanto, esta molécula foi escolhida para ser utilizada na construção da proteína híbrida rPspA-PotD.

4.2.2 Clonagem, produção e purificação das proteínas híbridas rPspA-PotD e rPotD-PdT

As proteínas híbridas foram produzidas pela fusão dos genes no vetor de expressão. Os fragmentos gênicos *pspA*, *pdT* e *potD* foram amplificados por PCR e ligados ao vetor pGEMT-easy. Após clivagens sequenciais com enzimas de restrição e ligação dos insertos ao vetor pET28a, foram geradas as construções pET28a *pspA-potD* e pET28a *potD-pdT*. Estes vetores foram utilizados na transformação de bactérias *E. coli* BL21DE3; as proteínas híbridas foram expressas na forma solúvel e purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel - coluna HisTrap HP - seguida de cromatografia por troca catiônica – coluna HiTrap Q HP. Ao término da purificação, foram realizadas 3 lavagens com Triton X[®] -114 para a remoção do LPS proveniente da produção em *E. coli*. Foram realizadas análises por SDS-PAGE e *immunoblotting* das proteínas rPspA-PotD (Figuras 14A e B) e rPotD-PdT (Figuras 14 C e D).

Figura 14 - Análise das proteínas híbridas por SDS-PAGE e Western blot. A) SDS-PAGE da proteína rPspA-PotD purificada, onde: 1- Peso Molecular; 2- rPotD (≈ 44 kDa); 3- rPspA (≈ 51 kDa) e 4- rPspA-PotD (≈ 95 kDa). B) Análise da proteína híbrida por *immunoblotting* utilizando soros anti-rPspA-P490 (1 e 2) ou anti-rPotD (3 e 4) em: 1 - rPspA (controle), 2- rPspA-PotD, 3- rPotD (controle), 4- rPspA-PotD C) SDS-PAGE da proteína rPotD-PdT purificada, onde: 1- Peso Molecular; 2- rPotD (≈ 44 kDa); 3- rPdT (≈ 54 kDa); 4- rPotD-PdT (≈ 96 kDa). D) *immunoblotting* do reconhecimento da proteína híbrida pelos soros anti-rPotD ou anti-rPdT em: 1- rPotD (controle), 2- rPotD-PdT, 3- rPdT, 4- rPotD-PdT

Observa-se que as proteínas híbridas foram purificadas com baixos níveis de contaminantes, compatível com sua utilização nos ensaios de imunização, rPspA-PotD (Figura 14 A) e rPotD-PdT (Figura 14 C). Por possuir em sua estrutura uma região que é rica em aminoácidos prolina, a PspA apresenta um padrão de separação no gel de poliacrilamida peculiar, onde a proteína parece ter maior massa molecular do que descrita, por este motivo ela é verificada na região de 70 kDa quando possui apenas 51 kDa (Figura 14, A); as proteínas rPotD e rPdT apresentam tamanhos esperados, de 44 kDa e 54 kDa, respectivamente (Figuras 14 A e 14 C); rPspA-PotD também aparenta ser um pouco maior do que o predito, com a banda na região dos 115 kDa, enquanto rPotD-PdT apresentou tamanho aproximado de 96 kDa (Figuras 14 C e D).

A análise por *immunoblotting* (Figura 14B e 14D) revela o reconhecimento das proteínas híbridas pelos soros anti-rPotD e anti-rPspA (para o híbrido rPspA-PotD) e anti-

rPotD e anti-PdT (para o híbrido rPotD-PdT), confirmando que as proteínas de fusão mantêm os epítomos das proteínas originais.

Todas as proteínas foram eluídas em um volume final de 5 mL, com um rendimento total de 25 mg para a proteína rPotD, 9 mg da proteína rPdT e 10 mg da proteína rPspA. Os híbridos rPspA-PotD e rPotD-PdT apresentaram rendimentos de 20 mg e 12,5 mg, respectivamente. As proteínas isoladas e fusionadas foram utilizadas para a imunização dos camundongos.

4.3 Avaliação da resposta imune induzida pela imunização com os híbridos

4.3.1 Avaliação da resposta humoral induzida pelas imunizações.

A resposta imune humoral foi avaliada pela quantificação dos anticorpos do tipo IgG total produzidos contra as proteínas recombinantes purificadas e despirogenizadas. O soro obtido dos camundongos imunizados com 3 doses das proteínas recombinantes foram analisados por ELISA e determinadas as concentrações de IgG anti-rPspA e anti-rPotD (para o híbrido rPspA-PotD) ou anti-rPotD e anti-PdT (para o híbrido rPotD-PdT) .

A imunização de camundongos com o híbrido rPspA-PotD foi capaz de induzir níveis significativamente maiores de anticorpos IgG, tanto contra rPspA quanto contra rPotD, quando comparado com os animais imunizados com as proteínas isoladas (Figura 15). Este resultado sugere que a proteína híbrida é capaz de aumentar a resposta imune contra os dois antígenos incluídos na formulação.

A proteína rPspA mostrou-se bem mais imunogênica do que rPotD, induzindo uma produção de anticorpos específicos 40 vezes maior. Comparando-se os níveis de anticorpos induzidos contra rPspA e rPotD pelo híbrido, observa-se um aumento de 45 vezes na produção de anticorpos anti-PspA em comparação com os anticorpos anti-PotD (Figuras 15 A e B).

Figura 15 – Quantificação de anticorpos induzidas pela imunização de camundongos com r-PspA-PotD, rPspA ou rPotD por ELISA. Soros de animais imunizados (n = 5 animais) foram testados individualmente para a presença de anticorpos anti-rPotD ou anti-rPdT. Como controle os animais receberam hidróxido de alumínio em PBS. Onde: *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$

Animais imunizados com o híbrido rPotD-PdT mostram o reconhecimento das proteínas rPotD e rPdT no soro analisado por ELISA (Figura 16 A e B). Analisando os resultados dos anticorpos anti-rPotD podemos verificar que tanto o grupo que recebeu a proteína rPotD, quanto o grupo que recebeu as proteínas coadministradas tiveram índices similares de anticorpos; o grupo que recebeu a proteína híbrida, no entanto, atingiu uma quantidade de anticorpos cerca de 2,5 vezes maior do que os outros grupos. Para os anticorpos anti-rPdT, podemos verificar que todos os grupos que receberam PdT produziram quantidades estatisticamente comparáveis entre si de anticorpos anti-PdT.

Observamos que a administração da proteína híbrida induziu níveis similares de anticorpos anti-rPdT quando comparado com todos os outros grupos e induziu níveis de anticorpos anti-rPotD muito maiores do que os grupos que receberam a rPotD sozinha ou coadministrada com o rPdT. Confirmando que a proteína foi capaz de melhorar a imunogenicidade da proteína híbrida.

Figura 16 - Quantificação de anticorpos (IgG total) contra rPotD e rPdT nos soros de animais imunizados com rPotD-PdT. Soro de animais imunizados (n = 5 animais) foram testados individualmente contra a presença de anticorpos anti-rPotD ou anti-rPdT. Como controle foi utilizado o soro dos animais que receberam apenas hidróxido de alumínio em salina. Onde: ***p<0,001 e **p<0,01, quando utilizado teste ANOVA e ⁰⁰⁰p<0,001 e ⁰⁰p<0,01, quando utilizado teste t-student entre o grupo analisado e o grupo controle, N.D = Não Diferente.

4.3.2 Ensaio de ligação dos anticorpos à superfície de pneumococos.

Uma vez comprovada a capacidade dos anticorpos induzidos pelas fusões de reconhecerem as proteínas incluídas em cada formulação, foi realizado ensaio de ligação para determinar a capacidade dos anticorpos induzidos em reconhecer e se ligarem à superfície das bactérias. Isolados de pneumococo foram incubados na presença do soro de camundongos imunizados com as proteínas isoladas e híbridos, seguido pela incubação com anticorpos marcados com FITC e análise da fluorescência em citômetro. O padrão utilizado para avaliação foi a porcentagem de células bacterianas positivas (com intensidade de fluorescência superior a 10^1), comparando-se o soro dos animais imunizados com o soro controle (proveniente de camundongos que receberam o adjuvante em salina).

Para avaliação do híbrido rPotD-PdT e das proteínas isoladas e coadministradas, foram utilizados os pneumococos St RM200, St A66.1, St M10, St 0603 e St ATCC6303. Os resultados desta análise são mostrados na Figura 17.

Figura 17 – Ligação dos anticorpos anti-rPotD-PdT e suas proteínas isoladas à superfície de pneumococos. As bactérias foram incubadas com os soros dos animais imunizados com rPotD, rPdT, rPotD + rPdT, rPotD-PdT ou apenas com o adjuvante em salina (controle), seguidos de uma incubação com um anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com FITC e analisados por citometria de fluxo. A porcentagem de bactérias fluorescentes foi calculada para cada amostra. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ analisado por ANOVA seguido de teste Tukey. Os valores representam a média dos valores medidos para o soro de 5 animais por grupo.

Para as cepas St 0603 e St 245/00, todos os soros testados foram capazes de se ligar à superfície da bactéria de forma mais eficiente que o soro do grupo controle. Apesar de todos os soros se ligarem com maior intensidade quando comparado com o grupo controle na cepa St ATCC 6303, essa ligação não foi superior a 20% para nenhum dos soros utilizados, sugerindo uma ligação ineficiente nesta bactéria. Para a bactéria St RM200, que não possui cápsula, somente os soros dos grupos coadministrado e híbrido se ligaram mais

eficientemente do que o soro dos animais do grupo controle. Tanto para as cepas St M10 quanto St A66.1, somente o soro dos animais imunizados com a proteína híbrida foi capaz de se ligar mais eficientemente à superfície da bactéria em comparação com o soro dos animais do grupo controle. Em resumo, observa-se que os anticorpos contra o híbrido apresentaram maior amplitude de ligação, sendo capazes de reconhecer 5 das 6 bactérias avaliadas. Estes resultados confirmam os dados do ELISA, indicando que a imunização de camundongos com o híbrido rPotD-PdT, induz a produção de anticorpos capazes de reconhecer as proteínas nativas expressas pelos pneumococos.

Para avaliação dos anticorpos induzidos pelo híbrido rPspA-PotD, foi utilizado um painel mais amplo de isolados de pneumococo, a fim de se avaliar o reconhecimento cruzado das moléculas de PspA expressas pelas bactérias. Os pneumococos utilizados neste ensaio foram: St 245/00; St P69, St P47, St D39, St WU2, St A66.1, St Tigr4, St P46, St JY189 e St JY119. A Figura 18 mostra a ligação dos anticorpos aos diversos isolados bacterianos.

Figura 18 - Ligação dos anticorpos contra o híbrido rPspA-PotD e suas proteínas isoladas, à superfície de pneumococos. As bactérias foram incubadas com os soros dos animais imunizados com rPotD, rPspA, rPspA-PotD ou apenas com o adjuvante em salina (controle), seguidos de uma incubação com um anticorpo anti-igG de camundongo conjugado com FITC e analisados por citometria de fluxo. A porcentagem de bactérias fluorescentes foi calculada para cada amostra. ***p < 0.001; **p < 0.01; *p < 0.05 analisado por ANOVA seguido de teste Tukey. Os valores representam a média dos valores medidos para o soro de 5 animais por grupo.

Os soros dos animais imunizados com a rPspA e com a proteína híbrida rPspA-PotD apresentaram quantidade similar de células positivas para os isolados: St 245/00, St P69, St P47, St D39, St WU2, St A66.1, e St P46. Interessantemente, a ligação dos anticorpos foi bastante eficiente mesmo quando incubados com bactérias que possuem PspAs de família 1 (clados 1 e 2), confirmando a alta reatividade cruzada obtida pelo soro induzido contra a PspA selecionada. Como controle, foram avaliadas duas cepas (St JY182 e St JY119) que possuem o gene da PspA deletado, nas quais, não houve ligação dos soros. Em uma destas cepas, St JY119, foi possível observar uma modesta (porém significativa) ligação do soro anti-PotD. Nos demais isolados, não foi observada ligação deste soro. Em um dos isolados, St Tigr4, os anticorpos contra o híbrido apresentaram ligação superior aos

demaís grupos. De modo geral, a imunização com o híbrido rPotD-PdT foi capaz de produzir anticorpos capazes de se ligar mais eficientemente que os anticorpos gerados pelas proteínas sozinhas ou coadministradas, porém com intensidade de fluorescência e quantidade de células positivas inferiores aos atingidos pelos soros anti-rPspA e anti-rPspA-PotD.

4.3.4 Ensaio de opsonofagocitose de pneumococos na presença do soro dos animais imunizados com os híbridos.

A capacidade dos soros dos animais imunizados de potencializar a opsonofagocitose dos pneumococos foi avaliada *in vitro* utilizando células peritoneais murinas. Estas células foram incubadas com as bactérias na presença dos soros específicos contendo anticorpos contra as proteínas vacinais e uma fonte de complemento. Os resultados apresentados referem-se ao número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas após incubação em comparação com o soro dos animais injetados somente com o adjuvante (controle). Na Figura 19, são mostrados os resultados para o híbrido rPspA-PotD e suas proteínas isoladas.

Figura 19 – Fagocitose de pneumococos *in vitro* mediada por anticorpos induzidos contra a proteína híbrida rPspA-PotD. As bactérias foram incubadas com os anticorpos dos animais imunizados com rPotD-PdT, as respectivas proteínas isoladas, ou com ou apenas com o adjuvante em salina (controle), uma fonte de complemento e fagócitos peritoneais murinos, seguidos de uma incubação em placas de meio ágar sangue. As UFC recuperadas foram contadas após incubação por 18 h. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ analisado por ANOVA seguido de teste Tukey. Os valores representam a média das CFUs recuperadas após incubação com o soro de 5 animais por grupo.

É possível observar que os anticorpos contra o híbrido rPspA-PotD apresentaram elevada capacidade opsonizante, aumentando a fagocitose de todas as cepas de pneumococo investigadas. O soro anti rPspA apresentou um efeito um pouco menor, levando a uma redução no número de UFC em seis dos sete isolados testados (St 0603, St A66.1, St D39, St Tigr4, St P490 e St ATCC 6303). Os anticorpos anti rPotD, por outro lado, promoveram uma redução no número de UFC recuperadas apenas para as bactérias St 0603, St D39 e St A66.1. Estes resultados reforçam o potencial vacinal da vacina híbrida rPspA-PotD, induzindo a produção de anticorpos funcionais, capazes de favorecer o reconhecimento e fagocitose de diferentes cepas de pneumococo.

O efeito opsonizante dos anticorpos induzidos contra o híbrido rPotD-PdT e suas proteínas isoladas foi demonstrado sobre a fagocitose de cepas de *S. pneumoniae* St RM200, St A66.1, St 0603, St M10, St 245/00 e St ATCC 6303 (Figura 20).

Figura 20 – Fagocitose de pneumococos *in vitro* mediada por anticorpos induzidos contra a proteína híbrida rPotD-PdT. As bactérias foram incubadas com os anticorpos dos animais imunizados com rPotD, rPdT, rPotD + rPdT, rPotD-PdT ou apenas com o adjuvante em salina (controle), uma fonte de complemento e fagócitos peritoneais murinos, seguidos de uma incubação em placas de meio ágar sangue. As UFC recuperadas foram contadas após incubação por 18 h. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ analisado por ANOVA seguido de teste Tukey. Os valores representam a média das CFUs recuperadas após incubação com o soro de 5 animais por grupo.

De forma semelhante ao observado com a fusão rPspA-PotD, os anticorpos contra o híbrido rPotD-PdT favoreceram a fagocitose de todas as cepas de pneumococo avaliadas, com exceção da St ATCC 6303. Em três dos 6 isolados, apenas o soro contra o híbrido foi eficaz em promover uma redução no número de bactérias recuperadas, enquanto os anticorpos contra as proteínas sozinhas ou coadministradas não apresentaram este efeito. A cepa St RM200, embora desprovida de cápsula, foi bastante resistente à fagocitose, que só foi eficiente na presença do soro contra o híbrido. Os anticorpos contra rPdT ou a proteína coadministrada à rPotD promoveram um aumento na fagocitose de apenas dois dos 6 isolados investigados, enquanto rPotD sozinha não induziu anticorpos com capacidade opsonizante neste ensaio. Em conjunto, os resultados sugerem que os híbridos rPspA-PotD e rPotD-PdT induzem a produção de anticorpos capazes de promover a fagocitose de pneumococos com maior eficácia do que as proteínas isoladas e coadministradas.

4.3.5 Avaliação da produção de óxido nítrico por células do peritônio em cultura.

Após a investigação da resposta imune humoral e funcionalidade dos anticorpos produzidos pela imunização com as proteínas, foi avaliada a ativação de respostas celulares induzidas pela proteína de fusão rPotD-PdT. A produção de óxido nítrico nos camundongos imunizados foi quantificada *in vitro*, em cultura de células peritoneais na presença dos estímulos específicos rPotD ou rPdT por 48 h, ou mantidas sem estímulo.

Figura 21 - Produção de óxido nítrico pelas células peritoneais de camundongos imunizados, induzida pela administração de rPotD-PdT. A produção de óxido nítrico foi avaliada após 48 h do cultivo das células dos animais imunizados, na presença ou não de estímulo específico com rPotD ou rPdT. Como controle, foram utilizadas as células dos animais que receberam adjuvante em salina. Onde: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ analisado por ANOVA seguido de teste Tukey. N.D = Não Diferente.

O óxido nítrico foi detectado no sobrenadante das células peritoniais dos grupos imunizados após o estímulo com rPotD, o que sugere que a proteína rPotD sozinha, coadministrada ou em fusão com o rPdT é capaz de induzir uma resposta bastante específica, uma vez que as células dos animais do grupo controle não reagiram produzindo o reativo de oxigênio quando estimuladas (Figura 21).

A análise do gráfico evidencia ainda que as células dos animais imunizados com rPotD e com a proteína híbrida rPotD-PdT foram capazes de produzir o metabólito em maior quantidade quando comparadas com as células dos animais controle e dos animais que receberam as proteínas coadministradas.

Também foram realizadas as análises para culturas de células do peritônio, após imunização com rPotD-PdT, realizando o estímulo com a proteína rPdT porém nenhum grupo foi capaz de produzir quantidades significativas de óxido nítrico.

4.3.6 Determinação da produção de citocinas por ELISA.

Para a determinação do perfil de produção das citocinas induzidas pela imunização com a proteína híbrida rPotD-PdT, esplenócitos dos animais imunizados com as proteínas isoladas ou o híbrido foram cultivados com rPotD, rPdT ou sem estímulo, e o sobrenadante das culturas utilizado para a quantificação das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-17 (essas três citocinas foram escolhidas por consistirem nos principais marcadores dos tipos de resposta celular Th1 – quando o INF- γ é a principal citocina produzida, Th2 – quando a IL-4 é a principal citocina detectada, e Th17 – quando a IL17 é a citocina mais produzida) (ABBAS, 1997; MALLEY et al., 2003; MOFFITT et al., 2011).

Figura 22 – Produção de citocinas no sobrenadante dos esplenócitos dos animais imunizados com rPotD-PdT. Camundongos BALB/c foram imunizados com 3 doses de rPotD + rPdT e rPotD-PdT; 14 dias após a última imunização os esplenócitos foram coletados e cultivados *in vitro* (1×10^6 células/poço) na presença ou ausência de estímulo com as proteínas rPotD e rPdT. A produção de **A) IFN- γ** e **B) IL-17** foi avaliada. As diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando-se o teste t de student. *** p < 0.001;

**p <0.01; *p <0.05 comparando-se os valores dos dos grupos imunizados e estimulados e o grupo controle e estimulado.

Observa-se que os esplenócitos dos animais imunizados com a fusão rPotD-PdT foram capazes de produzir IFN- γ em níveis comparáveis ao grupo coadministradas, após os estímulos específicos com rPotD e rPdT (Figura 22A). No entanto, uma elevada produção desta citocina também foi observada neste grupo na ausência de estímulo específico. Em todos os casos, a quantidade de IFN- γ foi estatisticamente superior à secretada pelo grupo controle quando estimulado. Também foi detectada a produção de IL-17 no grupo imunizado com a proteína híbrida, na presença dos dois estímulos específicos – rPotD; no grupo coadministrado, a produção de IL-17 foi detectada apenas no grupo estimulado com rPotD, porém de forma não significativa em relação ao controle. Os níveis de IL-4 também foram avaliados, porém nenhum grupo foi capaz de produzir quantidades estatisticamente relevantes destas citocinas (resultado não apresentado).

Uma vez que a proteção induzida pela proteína rPspA é exclusivamente dada pela indução de anticorpos opsonizantes e que a proteção contra a colonização é correlacionada com a produção da citocina IL-17, escolhemos avaliar apenas a presença dessa citocina no sobrenadante da cultura de esplenócitos dos animais imunizados com rPspA-PotD, conforme mostra a Figura 23.

Figura 23 – Análise da produção da citocina IL-17 nos animais imunizados com rPspA-PotD. Camundongos BALB/c foram imunizados com 3 doses de rPotD, rPspA ou rPspA-PotD; 14 dias após a última imunização os esplenócitos foram isolados e cultivados (1×10^6 células/poço) na presença e ausência do estímulo com as proteínas rPotD e rPspA. A produção de IL-17 foi detectada por ELISA. As diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando-se o teste t de student, onde: *** p <0.001; ** p <0.01; * p <0.05 comparando-se os valores dos dos grupos imunizados e estimulados e o grupo controle e estimulado.

Observa-se um aumento na secreção desta citocina pela imunização com a fusão rPspA-PotD, após estímulos com rPotD e rPspA, um efeito semelhante ao observado nos grupos imunizados com as proteínas isoladas.

Em resumo, a análise da produção de citocinas pela imunização com os híbridos demonstra que a imunização com rPotD-PdT induziu a produção de IFN- γ e quantidade inferior de IL-17 quando comparado com o híbrido rPspA-PotD.

4.4 Avaliação da proteção conferida pelas vacinas híbridas

Após os ensaios *in vitro* apontarem resultados promissores para a utilização das proteínas híbridas rPspA-PotD e rPotD-PdT, a proteção em camundongos imunizados com estas fusões foi avaliada em dois modelos distintos: ensaio de colonização nasal e desafio letal (sepsis) por inoculação nasal. As etapas a seguir descrevem os resultados obtidos para estes ensaios.

4.4.1 Ensaio de desafio letal

O potencial protetor das vacinas híbridas contra infecção sistêmica por pneumococo foi avaliado pela inoculação intranasal dos camundongos, com as cepas virulentas St A66.1 e St ATCC 6303. A sobrevivência dos animais foi acompanhada durante 21 dias, e comparada com o grupo controle (adjuvante em solução salina). Os resultados desta análise são mostrados na Figura 24.

A) St A66.1 (Sorotipo 3, Clado 2) St A66.1 (Sorotipo 3, Clado 2)

Figura 24 – Tempo de sobrevivência (em dias) dos animais imunizados após desafio intranasal com *S. pneumoniae*. Grupos com 10 animais foram imunizados por via subcutânea com as proteínas isoladas, coadministradas ou fusionadas e desafiados com as bactérias St ATCC6303 (A) e St A66.1 (B), 14 dias após a última das 3 imunizações, e monitorados durante 21 dias. Cada ponto representa o tempo de sobrevivência de um animal. As linhas horizontais representam a média de sobrevivência em cada grupo. O grupo controle é composto por animais que receberam apenas adjuvante em salina. Onde: *** $p < 0,001$ analisado por ANOVA seguido de teste Tukey. N.D = Não Diferente.

Observa-se que tanto a proteína rPspA quanto a fusão rPspA-PotD foram capazes de proteger os animais contra infecção sistêmica com as duas cepas de pneumococo testadas. Como observado nos ensaios de ligação e opsonofagocitose, a proteção foi efetiva mesmo utilizando uma bactéria que possui uma PspA de família heteróloga. Por outro lado, apesar dos correlatos de proteção indicarem a proteína rPotD-PdT como um bom candidato vacinal, o híbrido não foi capaz de proteger os animais contra a morte por sepse por nenhuma das cepas testadas. De forma semelhante, as proteínas PotD e PdT isoladas ou coadministradas não conferiram proteção neste modelo.

4.4.2 Ensaio de colonização

A fim de avaliar o efeito da imunização com as proteínas sobre a colonização nasal, camundongos imunizados foram desafiados pela inoculação nasal do pneumococo St 0603. Após 7 dias, o lavado nasal dos animais foi coletado e plaqueado para contagem bacteriana. Conforme mostrado na Figura 25, a imunização com a proteína rPotD, bem como o híbrido rPspA-PotD (Figura 25A), levaram a uma redução significativa no número

de bactérias recuperadas da nasofaringe, em comparação com o grupo controle. No grupo imunizado com o híbrido rPotD-PdT, embora seja possível observar uma aparente redução no número de bactérias recuperadas, não houve diferença significativa (Figura 25B). A proteína PspA também não se mostrou protetora no modelo de colonização (Figura 25A).

Em conjunto, os ensaios de proteção induzida pelas vacinas sugerem que o híbrido PspA-PotD é um candidato vacinal promissor, capaz de proteger contra doença invasiva e contra a colonização da nasofaringe.

Figura 25– Colonização da nasofaringe de camundongos imunizados com rPspA-PotD ou rPotD-PdT após desafio intranasal. Camundongos BALB/c (10 por grupo) foram imunizados com as proteínas rPotD, rPspA e rPspA-PotD (A) e rPotD e rPotD-PdT (B) ou adjuvante em salina (controle) e desafiados 14 dias após a última imunização com a bactéria St 0603. Após 7 dias do desafio os animais foram eutanasiados, o lavado nasal foi coletado, diluído e plaqueados em placas de ágar sangue e incubados 18 h a 37° C em anaerobiose. O número de UFC recuperadas para cada animal está expresso no gráfico, onde as barras horizontais representam a mediana obtida em cada grupo. **p <0.01; *p <0.05 analisado por ANOVA seguido de teste Tukey.

4.5 Investigação do papel de poliaminas na formação de biofilme por *S. pneumoniae* *in vitro*

Para determinar a capacidade de formação de biofilme por pneumococos na presença das principais poliaminas transportadas pela PotD, foi utilizado o protocolo descrito por Yadav e cols em que a cepa de pneumococo St 0603 foi incubada na presença de quantidades crescentes de espermidina ou putrescina em diferentes tempos (YADAV;

CHAE; SONG, 2012). A bactéria cultivada em meio TSB sem adição das poliaminas foi utilizada como controle.

É possível observar que a adição de poliaminas no meio de cultura limitou a formação de biofilme, tanto para espermidina quanto para putrescina e que este efeito foi dependente da dose de poliaminas adicionada (Figura 26). A presença de 2 mM de espermidina ou putrescina levou a uma redução significativa na formação de biofilme na maior parte dos tempos avaliados. Para a espermidina, o aumento na concentração levou a uma drástica redução na adesão da bactéria à placa de poliestireno especialmente após 8 e 10 h de cultivo. Este resultado também foi observado com a maior concentração de putrescina, porém neste caso, nos tempos 6 e 10 h.

Figura 26 - Formação de biofilme por *S. pneumoniae* *in vitro* na presença de poliaminas. A formação de biofilme foi avaliada após 6, 8 e 10 h de cultivo do isolado St 0603 em microplaca, na presença de diferentes concentrações de espermidina ou putrescina. A absorbância das amostras coradas com cristal violeta foi determinada em comprimento de onda 570 nm. A absorbância da bactéria cultivada somente em meio TSB (controle) foi considerada 100% e as porcentagens dos grupos adicionados de espermidina ou putrescina, calculadas a partir do grupo controle. Os resultados expressos são representativos de 2 experimentos realizados em triplicata. ***p < 0.001; **p < 0.01 analisado por ANOVA seguido de teste Tukey.

O tempo de cultivo teve um menor efeito sobre a formação de biofilme na presença das poliaminas; com 6 h de cultivo já se observa uma redução na formação de biofilme. Em todos os períodos avaliados, a adição de poliaminas em concentração igual ou superior a 1 mM limitou a formação de biofilme na placa.

5 DISCUSSÃO

As vacinas baseadas em proteínas recombinantes constituem uma alternativa promissora contra doenças pneumocócicas, por seu elevado potencial imunogênico e menor variabilidade sorológica, em comparação com as vacinas polissacarídicas. Um grande número de proteínas tem sido investigadas, e formulações incluindo uma ou mais proteínas já foram inclusive utilizadas em ensaios clínicos (FERREIRA et al., 2009; KAMTCHOUA et al., 2013; SHAK; VIDAL; KLUGMAN, 2013).

Por sua localização na superfície da bactéria – o que a torna acessível à ligação de anticorpos (SHAH et al., 2006), a proteína PotD vem sendo estudada como possível candidato vacinal contra o pneumococo em diferentes modelos de infecção. Camundongos imunizados com PotD apresentaram proteção contra sepse por pneumococos virulentos (SHAH; SWIATLO, 2006). Também foi demonstrado que a imunização intranasal de camundongos com rPotD reduz a colonização da nasofaringe por pneumococo (MIN et al., 2012; SHAH et al., 2009). Com base no potencial protetor de PotD, o presente trabalho teve como objetivo aprofundar o conhecimento sobre a resposta imune induzida por esta proteína, sozinha ou combinada a dois outros antígenos bem caracterizados de pneumococo: PspA e Pneumolisina. Também foi investigada a contribuição da proteína PotD para a formação de biofilme, um mecanismo importante para a colonização da nasofaringe.

A primeira etapa deste trabalho teve como objetivo confirmar os dados da literatura sobre o potencial protetor da proteína PotD. Para tanto, o gene *potD* foi clonado em sistema de expressão recombinante em procariotos. A construção resultante, *pET28a-potD*, foi utilizada na transformação de *E. coli*, onde a produção da proteína rPotD foi induzida, sendo posteriormente purificada por cromatografia de afinidade ao níquel e por troca catiônica. Este processo se mostrou adequado para a produção e purificação de rPotD, originando uma proteína com poucos contaminantes e em elevada concentração, semelhante ao observado para outras proteínas de pneumococo produzidas pelo mesmo sistema (DARRIEUX et al., 2008; GODFROID et al., 2011; GOULART et al., 2011; KANCLERSKI; MOLLBY, 1987). A proteína rPotD foi utilizada na imunização subcutânea de camundongos, tendo se mostrado imunogênica.

A resposta imune celular foi analisada pela cultura dos esplenócitos e das células peritoneais dos animais imunizados, na presença de estímulos específicos. Vários estudos demonstraram a importância da produção de citocinas do tipo Th1 na proteção pela

infecção causada pelo pneumococo (HOULDSWORTH; ANDREW; MITCHELL, 1994; LU et al., 2008; LUNDGREN et al., 2012; MAHDI et al., 2008; MIN et al., 2012; PALANIAPPAN et al., 2005; SINGH et al., 2010). Em nosso trabalho verificamos a presença significativa das citocinas INF- γ e IL-2 (citocinas associadas a resposta do tipo Th1) pelos esplenócitos dos animais imunizados e estimulado com a proteína rPotD. Por outro lado, observamos a produção da citocina IL-5 (associada a resposta do tipo Th2) Singh e cols encontraram a produção de IL-5 quando utilizaram peptídeos da proteína PspA na imunização de camundongos (SINGH et al., 2010); considera-se que IL-5 é uma citocina responsável pela ativação e diferenciação de células B (KOURO; TAKATSU, 2009), porém não existem trabalhos que correlacionem a produção de IL-5 com a proteção contra o pneumococo. Em nosso trabalho verificamos a produção de elevados níveis de IL-17, vários trabalhos já demonstraram a importância da produção de IL-17 principalmente para a proteção contra o pneumococo. Nesses trabalhos uma maior presença de IL-17 está associada a proteção contra a colonização (LU et al., 2008; MALLEY et al., 2001; MALLEY et al., 2006; WEISER; KAPOOR, 1999).

As células peritoneais dos camundongos imunizados com rPotD responderam ao estímulo com a proteína produzindo óxido nítrico. Sabe-se que o NO é produzido como uma resposta primária ao estímulo de uma citocina ou a interação com um patógeno, e pode ser considerado como um marcador da resposta celular inata (BOGDAN, 2001; BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000).

A caracterização da resposta imune humoral ocorreu pelos ensaios de ligação de anticorpos e opsonofagocitose *in vitro*. Trabalhos anteriores mostraram que o soro de animais imunizados com rPotD é capaz de se ligar à proteína nativa na superfície do pneumococo (SHAH et al., 2006; SHAH; ROMERO; SWIATLO, 2008); o presente trabalho confirmou o reconhecimento da bactéria St 0603 pelos anticorpos anti-rPotD, sendo que os níveis de anticorpos e a intensidade de fluorescência alcançada foram similares aos observados naqueles estudos (SHAH et al., 2006; SHAH; ROMERO; SWIATLO, 2008).

É reconhecido que a opsonofagocitose é a principal via de eliminação do pneumococo pelo sistema imune do hospedeiro (VITHARSSON et al., 1994). Dessa forma, a capacidade de induzir a produção de anticorpos opsonizantes que promovam um aumento na eliminação da bactéria pelos fagócitos, é uma característica desejada em antígenos vacinais contra esse microrganismo. A fim de avaliar o potencial opsonizante

dos anticorpos induzidos pela imunização com rPotD, foi realizado um ensaio de opsonofagocitose *in vitro* utilizando células peritoneais murinas frescas, padronizado por nosso grupo de pesquisa para avaliação de proteínas vacinais (GOULART et al., 2013; GOULART et al., 2011; PERCIANI et al., 2013). Os resultados mostraram uma redução no número de bactérias recuperadas após a incubação com o soro dos animais imunizados, quando comparado com o grupo controle.

Em conjunto, os resultados dos ensaios de ligação e opsonofagocitose sugerem que os anticorpos anti-rPotD são capazes de reconhecer a proteína PotD na superfície da bactéria, opsonizando-a e favorecendo sua fagocitose. Estes dados reforçam o potencial da proteína PotD como candidato vacinal contra o pneumococo, mostrando que o principal mecanismo de eliminação da bactéria está ocorrendo.

Uma vez determinados os efeitos desencadeados pela imunização com rPotD, foi avaliada a capacidade desta proteína em induzir proteção em modelos de infecção invasiva e colonização. Embora tenha sido observada a produção de anticorpos no soro e citocinas após estímulo *in vitro*, a imunização com PotD não protegeu os camundongos contra sepse por pneumococos dos isolados A66.1 e St 6303. Poucos trabalhos demonstraram que a proteína rPotD é protetora em modelos animais; nestes trabalhos a proteção foi avaliada pela utilização de camundongos de linhagem CBA/n (que não são capazes de induzir resposta imune contra polissacarídeos) (SHAH et al., 2009; SHAH; SWIATLO, 2006), ou pela imunização intranasal (MIN et al., 2012). Essas diferenças nas vias de imunização e desafio, bem como a linhagem de camundongos utilizados, podem explicar as diferenças na proteção observadas nesses estudos.

O potencial protetor de rPotD também foi avaliado em modelo de colonização já estabelecido (MALLEY et al., 2001). A imunização subcutânea dos camundongos foi capaz de protegê-los contra colonização pneumocócica, reduzindo o número de bactérias recuperadas no lavado nasal, em comparação com o grupo controle. Sabe-se que a colonização é o primeiro passo para o estabelecimento da infecção por pneumococo, e que pessoas colonizadas são o principal veículo para a disseminação da bactéria (AUSTRIAN, 1986; BRILES et al., 2005; GRAY et al., 1981; REVAI; MAMIDI; CHONMAITREE, 2008). Dessa forma, uma vacina eficaz deve ser capaz também de bloquear a aquisição da bactéria (AUSTRIAN, 1986; BRILES et al., 2005; GRAY et al., 1981; REVAI; MAMIDI; CHONMAITREE, 2008). A observação de que a imunização sistêmica com rPotD protege os animais contra colonização reforça os dados da literatura – que mostram um efeito

protetor do antígeno quando administrado pela via nasal (MIN et al., 2012; SHAH et al., 2009). Nossos resultados demonstram um aumento da opsonofagocitose da bactéria associado a elevada produção da citocina IL-17. O potencial de vacinas administradas por via sistêmica em conferir proteção contra colonização já foi observado com vacinas de DNA para PspA, e atribuído a elevada produção de IgG2a e diminuição dos níveis de IgG1 (FERREIRA et al., 2010). Roche e colaboradores demonstraram que anticorpos do tipo IgG são capazes de opsonizar a bactéria ainda na mucosa nasal e promover sua aglutinação gerando proteção contra a colonização (ROCHE et al., 2015). Camundongos *knockout* para o receptor de IL-17 são mais susceptíveis a infecção causada pelo pneumococo (LU et al., 2008); Malley e cols relacionaram a proteção contra a colonização com a produção de IL-17 (MALLEY et al., 2006). Nossos resultados estabelecem uma correlação entre a produção de anticorpos capazes de favorecer a opsonofagocitose, a produção de IL-17 e a proteção, podendo indicar possíveis mecanismos de proteção.

O presente trabalho também avaliou o potencial vacinal da proteína rPotD em fusão com a proteína PspA e o pneumolisóide PdT. PspA é considerada um importante candidato vacinal contra doenças pneumocócicas. Entretanto, sua variabilidade estrutural e sorológica pode limitar a cobertura de uma vacina baseada nesta proteína. Alguns trabalhos têm demonstrado que o nível de reatividade e proteção cruzada entre PspAs correlaciona-se com a similaridade entre suas sequências, sendo baixa entre PspAs de diferentes famílias e alta entre PspAs de mesma família (DARRIEUX et al., 2008; NABORS et al., 2000). Entretanto, tem sido sugerido que o nível de reatividade e proteção cruzadas sejam variáveis dependendo do isolado da PspA (DARRIEUX et al., 2008; NABORS et al., 2000). Por esta razão, previamente à fusão com rPotD, foi realizada a seleção de uma molécula de PspA pertencente à família 2 com alta reatividade cruzada. Para esta etapa foram clonados 8 fragmentos incluindo a região aminoterminal de PspAs pertencentes à família 2, sendo elas: 3 moléculas do clado 3, 3 do clado 4 e 2 do clado 5. A imunização de camundongos com essas proteínas levou a uma alta produção de anticorpos, resultado já esperado e que está de acordo com dados já publicados para outras moléculas de PspA (BRILES et al., 2000; DARRIEUX et al., 2007; GOULART et al., 2011; MCDANIEL et al., 1994).

Inicialmente foi realizada uma análise de *immunoblotting* dos soros contra extratos de pneumococos; foi observada uma elevada heterogeneidade no nível de reatividade cruzada induzida por diferentes rPspAs, um resultado já observado em trabalhos anteriores

(DARRIEUX et al., 2008; GOULART et al., 2011; NABORS et al., 2000). Os três soros mais imunorreativos – todos induzidos por moléculas do clado 4 – foram selecionados para avaliação da interação com pneumococos. A maior reatividade cruzada em PspAs do clado 4 já foi descrita anteriormente (DARRIEUX et al., 2008; MORENO et al., 2010), reforçando o potencial vacinal desta molécula. Os três soros selecionados foram avaliados em ensaio de deposição de complemento em pneumococos. A capacidade dos anticorpos anti-PspA de promover a deposição de C3b do sistema complemento na superfície da bactéria contribuem para o efeito protetor da proteína (BROWN; HOSEA; FRANK, 1983). No presente trabalho, os três soros avaliados induziram níveis similares de deposição de complemento. Já foi comprovado por nosso grupo que apesar de estarem classificadas dentro do mesmo clado, diferentes PspAs, são capazes de induzir diferentes níveis de proteção (GOULART et al., 2011). Por este motivo, os três soros foram avaliados em ensaio de opsonofagocitose.

A fagocitose dependente de anticorpos é considerada o principal mecanismo de morte do pneumococo (BROWN; HOSEA; FRANK, 1983; GOULART et al., 2011). Além disso, alguns estudos reportaram que a constituição da cápsula tem influência na ligação de anticorpos e a consequente deposição de complemento (MELIN et al., 2009). Por este motivo, optou-se por utilizar cepas com diferentes *backgrounds* genéticos, a fim de se investigar a amplitude do efeito dos anticorpos sobre pneumococos distintos. O soro anti PspA-P490 foi capaz de induzir a opsonofagocitose em uma maior quantidade de cepas testadas independentemente do tipo capsular, sugerindo que esta é a proteína que induz uma resposta imune com maior reatividade cruzada dentro da família 2. A habilidade dos anticorpos anti-PspA em promover a fagocitose em bactérias de diferentes sorotipos, inibindo os efeitos anti-fagocíticos da PspA exposta na superfície, reforça o potencial desta proteína como um candidato vacinal capaz de conferir respostas protetoras mais amplas. Dessa forma, a PspA produzida a partir da cepa P490 foi selecionada para fusão com rPotD, produzindo o híbrido rPspA-PotD.

O pneumolissoide PdT também foi escolhido para ser fusionado a PotD, por se tratar de uma proteína amplamente estudada e já ter sido utilizada eficientemente para melhorar a resposta imune quando fusionada a outras proteínas (GOULART et al., 2013; LU et al., 2009), formando rPotD-PdT. Todas as proteínas foram produzidas em altas concentrações na forma solúvel e as purificações foram bastante eficientes, gerando proteínas com alto grau de pureza. A análise por *immunoblotting* revelou que as proteínas híbridas foram

reconhecidas pelos anticorpos gerados pela administração das proteínas isoladas: anti-rPotD e anti-rPdT para o híbrido rPotD-PdT e anti-rPotD e anti-rPspA para o híbrido rPspA-PotD, sendo indicativo de que as proteínas híbridas foram capazes de manter os epítomos das proteínas originais. Resultado similar foi descrito para outras vacinas baseadas em proteínas de pneumococo fusionadas (DARRIEUX et al., 2007; GOULART et al., 2013; LU et al., 2015).

A resposta imune humoral induzida pela administração das proteínas quiméricas rPotD-PdT e rPspA-PotD em camundongos foi comparada com a resposta induzida pelas proteínas sozinhas ou coadministradas. O híbrido rPspA-PotD foi o mais imunogênico, seguido pela proteína rPspA sozinha, o híbrido rPotD-PdT e as proteínas rPotD e rPdT, respectivamente. A PspA é uma proteína amplamente estudada e que possui uma elevada imunogenicidade (DARRIEUX et al., 2008; GOR et al., 2005; GOULART et al., 2013; VIROLAINEN et al., 2000), e reforça sua utilização em formulações vacinais contra o pneumococo. Nos dois casos, a produção de anticorpos contra os híbridos foi superior às proteínas isoladas, indicando que não houve competição antigênica entre as proteínas e sugerindo um possível efeito sinérgico resultante da fusão. Este resultado confirma o que foi obtido nas análises por *immunoblotting*, onde as proteínas híbridas foram capazes de manter os epitopos das duas proteínas originais. Em particular, a capacidade da fusão rPspA-PotD de potencializar a produção de anticorpos anti-rPspA permite inferir um possível efeito protetor dessa molécula; estudos com anticorpos anti-PspA demonstraram que a imunização passiva de camundongos é suficiente para promover proteção (BRILES et al., 2000; BROOKS-WALTER; BRILES; HOLLINGSHEAD, 1999).

A resposta imune celular induzida pelas fusões demonstra perfis parecidos de citocinas em cada grupo. A fusão rPotD-PdT induziu a produção de IFN- γ em quantidade semelhante ao observado para a proteína rPotD isolada e a produção de IL-17 em quantidade inferior a rPotD sozinha. A importância do IFN- γ na proteção contra pneumococos está descrita em vários trabalhos (HOULDSWORTH; ANDREW; MITCHELL, 1994; LU et al., 2008; LUNDGREN et al., 2012; MAHDI et al., 2008; MOFFITT et al., 2012; PALANIAPPAN et al., 2005) e sugere um potencial protetor para o híbrido. Complementando os resultados da análise de células do baço, um aumento na produção de óxido nítrico (NO) pelas células peritoneais dos animais imunizados com o híbrido rPotD-PdT sugere que a imunização foi capaz de promover a ativação de uma

resposta celular inata (BOGDAN, 2001; BOGDAN; ROLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000).

A resposta imune celular contra o híbrido rPspA-PotD revelou uma elevada produção da citocina IL-17, descrita como um importante correlato de proteção contra a colonização e infecções sistêmicas (LU et al., 2008; MALLEY et al., 2006). Mais especificamente, Min e cols mostraram que a imunização intranasal com a PotD recombinante aumentou a produção de IL-17a nos esplenócitos de camundongos BALB/c (MIN et al., 2012). Apesar das diferenças na via de administração e o uso da toxina colérica – um potente adjuvante – naquele trabalho, a imunização com PotD isolada também foi capaz de ativar a produção de IL-17 no presente estudo.

A funcionalidade dos anticorpos produzidos contra as proteínas híbridas foi avaliada através de ensaios de ligação a pneumococos e opsonofagocitose. Um aumento na ligação dos anticorpos foi observado para todas as bactérias quando foram incubadas com os anticorpos induzidos contra a proteína híbrida rPotD-PdT. Este aumento na ligação foi observado anteriormente para a fusão entre PspA e pneumolisóides, sendo correlacionados com o aumento na proteção contra o desafio invasivo contra o pneumococo (GOULART et al., 2013; LU et al., 2009). O mecanismo exato pelo qual a fusão de proteína melhora a resposta imune quando comparada com as proteínas sozinhas ou coadministradas ainda não é conhecido. Uma explicação possível seria que a fusão entre duas proteínas altera a estrutura das proteínas levando a exposição de epítomos que influenciam a qualidade dos anticorpos gerados.

Quando analisamos os resultados do ensaio de ligação para o híbrido rPspA-PotD, verificamos que tanto o soro dos animais imunizados com o híbrido quanto os imunizados apenas com a rPspA, foram capazes de ligar de forma bastante similar para todas as cepas analisadas. Observamos que mesmo possuindo uma quantidade 4 vezes maior de anticorpos o soro dos animais imunizados com a proteína híbrida não tiveram uma melhora significativa com relação ao soro anti-rPspA. Sabe-se que as PspAs de mesma família apresentem uma alta reatividade cruzada dentro da família, mas uma baixa reatividade cruzada com família heteróloga (DARRIEUX et al., 2008; HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000). Em nosso trabalho, observamos que mesmo pertencendo a família 2 a PspA escolhida foi capaz de se ligar de forma eficiente na superfície das bactérias que possuem PspA de família 1, sendo que este efeito foi estendido para o híbrido rPspA-PotD.

Estudos anteriores demonstraram que anticorpos anti-rPotD são capazes de se ligar mais facilmente em bactérias cujos sorotipos produzam cápsulas mais finas ou mesmo que não produzam cápsula (SHAH et al., 2006; SHAH; ROMERO; SWIATLO, 2008). Em nossos resultados, anticorpos contra rPotD não se ligaram eficientemente a uma cepa não encapsulada, a ausência da cápsula pode ter exposto outras proteínas e adesinas que restringiram a ligação do anticorpo à bactéria. No entanto, os anticorpos anti-rPotD foram capazes de se ligar eficientemente a outras bactérias dos sorotipos 14, 6B e uma cepa do tipo 3. Entretanto, a ligação dos anticorpos anti-rPotD foi menos eficiente quando comparada com o obtido em outro trabalho usando rPotD (SHAH; ROMERO; SWIATLO, 2008). Uma vez que a PotD nativa está acessível à ligação de anticorpos e as concentrações de anti-rPotD e a intensidade de fluorescência observada em nosso trabalho são similares aos níveis já reportados (SHAH et al., 2006; SHAH; ROMERO; SWIATLO, 2008), possíveis explicações para a menor capacidade de ligação observada em nossos estudos poderiam ser a variabilidade genética das cepas testadas, variações no sorotipo capsular, e a interação com outras proteínas de membrana; estes fatores podem interferir na exposição da PotD e consequentemente em seu reconhecimento pelos anticorpos (MIN et al., 2012; SHAH et al., 2009; SHAH; ROMERO; SWIATLO, 2008; SHAH; SWIATLO, 2006). Shah e colaboradores, mostraram que a PotD nativa é mais expressa em bactérias crescendo *in vivo* do que *in vitro* (SHAH; ROMERO; SWIATLO, 2008), outro fator que poderia explicar o resultado obtido.

Em concordância com os resultados obtidos no ensaio de ligação, anticorpos contra as proteínas híbridas foram capazes de aumentar a fagocitose de um grande número de pneumococos *in vitro*. O híbrido rPotD-PdT foi eficaz contra 5 das 6 cepas testadas. Como este efeito não foi observado para a rPotD sozinha, podemos considerar que a rPdT age como um adjuvante, melhorando a resposta imune contra PotD quando em fusão. De fato, este efeito adjuvante foi demonstrado para PdT e flagelina em fusão com outras proteínas de pneumococo (GOULART et al., 2013; LU et al., 2009; NGUYEN et al., 2011). O mesmo foi observado para o ensaio de opsonofagocitose utilizando o soro anti-rPspA-PotD. O soro da proteína híbrida foi capaz de aumentar a fagocitose para todas as bactérias testadas, sendo mais eficiente que os soros das proteínas separadas. Como esperado o soro anti-rPspA foi capaz de reduzir significativamente o número de UFC recuperadas para todas as bactérias pertencentes à família 2 e apenas 2 bactérias de clado 1, reforçando a hipótese de que a fusão das proteínas, possa influenciar na afinidade dos anticorpos que é

observada quando os soros são testados contra a proteína em sua conformação nativa na superfície do pneumococo. Esses resultados são comparáveis aos observados na conjugação de uma PspA de clado 1 com o polissacarídeo 6B, onde, embora o processo de conjugação tenha promovido uma redução de cerca de 20% da estrutura alfa-hélice da PspA, os anticorpos induzidos pela imunização com os conjugados promoveram uma maior opsonofagocitose da cepa de pneumococo testada, de forma independente do polissacarídeo capsular, que os anticorpos induzidos contra a PspA coadministrada com o PS (PERCIANI et al., 2013).

A habilidade de induzir anticorpos capazes de reconhecer várias cepas de pneumococos e promoverem o *clearance* pela fagocitose são fortes indicadores de proteção para as formulações testadas. Uma vez demonstrada a indução de resposta imune pela imunização com as proteínas híbridas rPotD-PdT e rPspA-PotD, foi investigada a capacidade dessas formulações vacinais de conferir proteção contra um desafio letal por sepse com dois isolados distintos, A66.1 e St 6303. Apesar dos resultados promissores nos ensaios *in vitro* – que mostraram que a fusão entre rPotD e rPdT poderia conferir uma resposta imune eficiente contra infecções pneumocócicas – nenhuma proteção foi observada com qualquer uma das cepas testadas, neste modelo. Outros estudos sugerem que PdT só é capaz de conferir proteção quando combinada a outros antígenos de pneumococo (FERREIRA et al., 2006a; GOULART et al., 2013). No entanto, o presente trabalho demonstrou que a fusão com PotD não foi capaz de ampliar a proteção dos animais contra desafio sistêmico. Em contrapartida, o híbrido rPspA-PotD induziu proteção contra as duas bactérias avaliadas neste modelo. O potencial protetor de PspA sozinha ou combinada a outros antígenos já foi atestado por vários grupos (FERREIRA et al., 2006a; GOULART et al., 2013; OGUNNIYI et al., 2007b; OLIVEIRA et al., 2010), estabeleceu-se que o potencial protetor da PspA se dá pela ação de anticorpos, sendo inclusive comprovada por experimentos de imunização passiva (BRILES et al., 2000; BROOKS-WALTER; BRILES; HOLLINGSHEAD, 1999; OGUNNIYI et al., 2007a; REN et al., 2004; REN et al., 2003; ROCHE et al., 2003). A proteção observada para o híbrido rPspA-PotD pode estar relacionada a este fato, uma vez que a imunização gerou a produção de anticorpos anti-rPspA cerca de 4 vezes superior ao da rPspA sozinha, que também foi protetora. Interessantemente, no presente estudo a imunização com PspA sozinha foi protetora contra o desafio com a cepa A66.1, que expressa uma PspA de

família diferente daquela utilizada na imunização. Este dado reforça a proteção cruzada conferida pela molécula de PspA selecionada para este projeto.

É reconhecido que a colonização é um processo necessário para a invasão pelo pneumococo (AUSTRIAN, 1986). Portanto, induzir proteção contra a colonização é uma propriedade muito importante para um candidato vacinal contra este patógeno. Em nosso trabalho testamos as formulações vacinais híbridas rPotD-PdT e rPspA-PotD em um desafio de colonização utilizando uma cepa de sorotipo 6B (não letal para camundongos) (MALLEY et al., 2001). Resultados prévios haviam demonstrado que a imunização intranasal com rPotD induzia proteção em desafio de colonização (SHAH et al., 2009), e nossos resultados estenderam estes estudos demonstrando que também a imunização sistêmica induz a significativa redução de colonização quando comparamos os grupos imunizados com rPotD e controle, porém no grupo que recebeu o híbrido rPotD-PdT houve uma aparente, mas não significativa, redução na colonização. Para a investigação da proteína rPspA-PotD, observamos que o grupo imunizado apenas com rPspA não foi capaz de mostrar proteção neste modelo de desafio, enquanto que os animais imunizados com o híbrido foram capazes de reduzir a colonização de forma significativa. Já foi descrito que imunização intranasal utilizando fragmentos de PspA foi capaz de gerar proteção contra a colonização (ARULANANDAM et al., 2001), mas esta proteção não foi observada pela imunização sistêmica (FERREIRA et al., 2010). Observamos que o grupo que recebeu a proteína híbrida rPspA-PotD foi capaz induzir proteção contra a colonização reduzindo o número de bactérias com relação ao controle. Essa proteção observada pode estar relacionada à produção de IL-17; o grupo imunizado com a proteína rPotD induziu a maior quantidade de IL-17, sendo o grupo onde o menor número de UFC foi observado, seguido pelo grupo que recebeu rPspA-PotD com menos IL-17 e uma média maior de UFC recuperadas, porém ainda significativa; por último o grupo rPotD-PdT, onde a menor quantidade da citocina resultou em uma quantidade maior de UFC recuperadas, não apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle. Estes resultados sugerem que a proteína rPspA-PotD foi capaz de herdar a propriedade protetora da proteína rPotD relacionada à maior indução de IL-17.

Para o desenvolvimento de uma vacina abrangente acreditamos que mais de uma proteína deverá ser incluída na sua composição. Alguns estudos veem demonstrando que a fusão de proteínas de pneumococo está sendo utilizada com o objetivo de ampliar e

melhorar a resposta imunológica de forma altamente eficiente (GOULART et al., 2013; LU et al., 2009).

De forma geral, nossos resultados sugerem que a formulação vacinal contendo as proteínas recombinantes PotD fusionada com PdT, é capaz de melhorar a resposta imune induzida contra o pneumococo quando comparada com as proteínas sozinhas ou combinadas, incluindo melhora na capacidade opsonofagocítica dos anticorpos. Porém, esta resposta não foi suficiente para conferir proteção contra as cepas utilizadas neste trabalho, tanto para o desafio letal quanto para o desafio de colonização. Por outro lado, a avaliação da resposta contra a proteína rPspA-PotD nos mostrou que a fusão além de melhorar a resposta imune foi capaz de herdar as propriedades protetoras das proteínas parentais. Com isso foi verificada a proteção no modelo de sepse (herdado da PspA) e no modelo de colonização (herdado da PotD), o que nos sugere que essa é a proteína mais interessante para a inclusão em uma vacina proteica. O maior potencial protetor da fusão rPspA-PotD em relação ao híbrido rPotD-PdT se relaciona com a maior produção de anticorpos (situação gerada pela ação da PspA) sendo responsável por promover a proteção contra o desafio de sepse e a diferença na quantidade de citocinas produzidas pelos 2 grupos. Sabendo que a indução de IL-17 é capaz de induzir proteção no modelo de colonização e que a quantidade de IL-17 presente no grupo rPspA-PotD foi maior do que a medida no grupo rPotD-PdT, acreditamos que o papel central desta citocina na proteção contra infecções por pneumococo – em particular nos modelos de colonização (KHAN; PICHICHERO, 2014) – sugere que a maior produção de IL-17 pela imunização subcutânea com a fusão rPspA-PotD está envolvida na proteção induzida por esta vacina e a menor quantidade de IL-17 induzida pela imunização com o híbrido rPotD-PdT não foi capaz de promover essa proteção.

Streptococcus pneumoniae é um patógeno que coloniza o sistema respiratório superior humano, e a formação do biofilme é um passo importante para a invasão e estabelecimento da infecção (CHAO et al., 2014; GRAY et al., 1981). Briles e cols demonstraram que a colonização nasal por pneumococos envolve a invasão local da mucosa, e que as populações bacterianas em diferentes nichos da cavidade nasofaríngea são morfologicamente distintas (BRILES et al., 2005). Resolvemos testar a hipótese de que as poliaminas transportadas pela PotD são importantes para a formação de biofilme em um ensaio *in vitro*. Como resultado, observamos que a adição de espermidina e putrescina

exógenas no meio de cultura foi capaz de afetar de forma significativa a formação do biofilme.

Nossos resultados estão de acordo com estudos publicados recentemente para outros patógenos formadores de biofilme. Um trabalho publicado para *Vibrio cholerae* revelou que a presença de espermidina no meio de cultura influenciava a formação do biofilme para esta bactéria (MCGINNIS et al., 2009). Em outro estudo com, *Yersinia pestis*, foi reportado que bactérias modificadas e incapazes de produzir espermidina e putrescina via síntese *de novo* formaram significativamente menos biofilme do que a bactéria selvagem (PATEL et al., 2006). Para *E. coli*, bactérias mutantes capazes de produzir mais PotD, tiveram uma significativa melhora na formação do biofilme (ZHANG et al., 2013). Estes resultados obtidos para outros organismos, bem como nosso resultado, sugerem que PotD, por ser o principal transportador de poliaminas para o pneumococo, tem papel importante e pode interferir na formação do biofilme.

6 CONCLUSÃO

A avaliação imunológica da proteína transportadora de poliaminas D (PotD) revelou seu potencial para inclusão em uma vacina pneumocócica, com a indução de anticorpos capazes de favorecer a opsonofagocitose da bactéria *in vitro*, além da produção de IL-17, uma citocina importante para o *clearance* dos pneumococos pelo hospedeiro. A imunização com rPotD foi capaz de reduzir a colonização bacteriana da nasofaringe, porém não foi protetora em modelo de sepse. Com a finalidade de ampliar o potencial protetor de rPotD, foram construídas proteínas quiméricas com PspA e PdT.

Devido à variabilidade estrutural e sorológica de PspA, foi selecionada uma molécula de família 2 capaz de induzir a formação de anticorpos com alta reatividade cruzada contra outras PspAs. A proteína selecionada, rPspA P490, induziu anticorpos com amplo reconhecimento de PspAs de família 2, capazes de induzir a fagocitose de um painel de isolados de pneumococo *in vitro*. Esta molécula foi utilizada para a construção do híbrido rPspA-rPotD. Por ser uma proteína com propriedades adjuvantes, que já havia sido utilizada para melhorar a resposta imune contra outras proteínas, o pneumolisóide, PdT, também foi utilizado para a construção da proteína híbrida rPotD-PdT.

A imunização de camundongos com as proteínas quiméricas foi capaz de ampliar a resposta imune quando comparadas com as proteínas isoladas. Foi observada um aumento no efeito opsonizante dos anticorpos, que favoreceram a fagocitose de um grande número de isolados clínicos de pneumococo. Também se observou a produção de citocinas nos esplenócitos dos animais imunizados, com uma maior secreção de IFN- γ induzida por rPotD-PdT, enquanto rPspA-PotD gerou níveis mais elevados de IL-17. A proteína rPotD-PdT não foi capaz de induzir proteção em nenhum desafio testado. Por outro lado, a fusão rPspA-PotD foi capaz de herdar as propriedades protetoras das proteínas parentais, conferindo proteção contra sepse, além de uma redução na colonização da nasofaringe.

É consenso que uma vacina proteica eficiente contra o pneumococo deve ser composta por mais de uma proteína; os resultados do presente trabalho sugerem que a fusão entre as proteínas PspA e PotD tem maior potencial protetor para ser utilizado em uma vacina pneumocócica.

Por fim, a investigação do papel das poliaminas transportadas pela PotD na formação de biofilmes pelo pneumococo revelou que a adição de poliaminas exógenas no meio de cultura altera a aderência da bactéria a uma superfície abiótica, sugerindo um papel importante tanto para as poliaminas, como para PotD na formação do biofilme.

REFERÊNCIAS*

ALEXANDER, J.E.; LOCK, R.A.; PEETERS, C.C.; POOLMAN, J.T.; ANDREW, P.W.; MITCHELL, T.J.; HANSMAN, D.; PATON, J.C. Immunization of mice with pneumolysin toxoid confers a significant degree of protection against at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 12, p. 5683-5688, 1994.

ALLEGRUCCI, M.; HU, F.Z.; SHEN, K.; HAYES, J.; EHRLICH, G.D.; POST, J.C.; SAUER, K. Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 7, p. 2325-2335, 2006.

ARAI, J.; HOTOMI, M.; HOLLINGSHEAD, S.K.; UENO, Y.; BRILES, D.E.; YAMANAKA, N. *Streptococcus pneumoniae* isolates from middle ear fluid and nasopharynx of children with acute otitis media exhibit phase variation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1646-1649, 2011.

ARULANANDAM, B.P.; LYNCH, J.M.; BRILES, D.E.; HOLLINGSHEAD, S.; METZGER, D.W. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A and interleukin-12 augments antibody-mediated opsonization and protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6718-6724, 2001.

AUSTRIAN, R.; GOLD, J. Pneumococcal Bacteremia with Especial Reference to Bacteremic Pneumococcal Pneumonia. **Annual International Medicine**, v. 60, n.1, p. 759-776, 1964.

AUSTRIAN, R. Some Aspects of the Pneumococcal Carrier State. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 18, n.1, p. 35-45, 1986.

AUSTRIAN, R.A. Pneumococcal infections. In: Germanier, R. (Ed.). **Bacterial vaccines**. New York: Academic Press, Inc., 1984, p.257-288.

BALACHANDRAN, P.; HOLLINGSHEAD, S.K.; PATON, J.C.; BRILES, D.E. The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 10, p. 3108-3116, 2001.

BASAVANNA, S.; KHANDAVILLI, S.; YUSTE, J.; COHEN, J.M.; HOSIE, A.H.; WEBB, A.J.; THOMAS, G.H.; BROWN, J.S. Screening of *Streptococcus pneumoniae* ABC transporter mutants demonstrates that LivJHMGF, a branched-chain amino acid ABC transporter, is necessary for disease pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3412-3423, 2009.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEALL, B.; GHERARDI, G.; FACKLAM, R.R.; HOLLINGSHEAD, S.K. Pneumococcal *pspA* sequence types of prevalent multiresistant pneumococcal strains in the United States and of internationally disseminated clones. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 10, p. 3663-3669, 2000.

BENTON, K.A.; VANCOTT, J.L.; BRILES, D.E. Role of tumor necrosis factor alpha in the host response of mice to bacteremia caused by pneumolysin-deficient *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 839-842, 1998.

BERGERON, Y.; OUELLET, N.; DESLAURIERS, A.M.; SIMARD, M.; OLIVIER, M.; BERGERON, M.G. Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 3, p. 912-922, 1998.

BERRY, A.M.; LOCK, R.A.; HANSMAN, D.; PATON, J.C. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 8, p. 2324-2330, 1989.

BERRY, A.M.; ALEXANDER, J.E.; MITCHELL, T.J.; ANDREW, P.W.; HANSMAN, D.; PATON, J.C. Effect of defined point mutations in the pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1969-1974, 1995.

BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. **Progress in Allergy**, v. 40, n.1, p. 1-43, 1988.

BITSAKTSIS, C.; IGLESIAS, B.V.; LI, Y.; COLINO, J.; SNAPPER, C.M.; HOLLINGSHEAD, S.K.; PHAM, G.; GOSSELIN, D.R.; GOSSELIN, E.J. Mucosal immunization with an unadjuvanted vaccine that targets *Streptococcus pneumoniae* PspA to human Fcγ receptor type I protects against pneumococcal infection through complement- and lactoferrin-mediated bactericidal activity. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 1166-1180, 2012.

BLANCHETTE-CAIN, K.; HINOJOSA, C.A.; AKULA SURESH BABU, R.; LIZCANO, A.; GONZALEZ-JUARBE, N.; MUNOZ-ALMAGRO, C.; SANCHEZ, C.J.; BERGMAN, M.A.; ORIHUELA, C.J. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation is strain dependent, multifactorial, and associated with reduced invasiveness and immunoreactivity during colonization. **MBio**, v. 4, n. 5, p. e00745-00713, 2013.

BLANCHETTE, K.A.; SHENOY, A.T.; MILNER, J., 2ND; GILLEY, R.P.; MCCLURE, E.; HINOJOSA, C.A.; KUMAR, N.; DAUGHTERY, S.C.; TALLON, L.J.; OTT, S.; KING, S.J.; FERREIRA, D.M.; GORDON, S.B.; TETTELIN, H.; ORIHUELA, C.J. Neuraminidase A exposed galactose promotes *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation during colonization. **Infection and Immunity**, v.84, n.10, p., 2016.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P.W. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 4, n. 3, p. 144-154, 2004.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological Review**, v. 173, n., p. 17-26, 2000.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

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. **Jornal of Infectious Disease**, v. 187, n. 8, p. 1206-1212, 2003.

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.

BRASIL. **Coordenação de Vigilância de Doenças Respiratórias e Imunoprevenções**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibd2012/matriz.htm> Acessado em 05/10/2016.

BRILES, D.E.; HOLLINGSHEAD, S.; BROOKS-WALTER, A.; NABORS, G.S.; FERGUSON, L.; SCHILLING, M.; GRAVENSTEIN, S.; BRAUN, P.; KING, J.; SWIFT, A. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1707-1711, 2000.

BRILES, D.E.; NOVAK, L.; HOTOMI, M.; VAN GINKEL, F.W.; KING, J. Nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* includes subpopulations of surface and invasive pneumococci. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6945-6951, 2005.

BROOKS-WALTER, A.; BRILES, D.E.; HOLLINGSHEAD, S.K. The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6533-6542, 1999.

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

BURRELL, M.; HANFREY, C.C.; MURRAY, E.J.; STANLEY-WALL, N.R.; MICHAEL, A.J. Evolution and multiplicity of arginine decarboxylases in polyamine biosynthesis and essential role in *Bacillus subtilis* biofilm formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 50, p. 39224-39238, 2010.

CAMPOS, I.B.; DARRIEUX, M.; FERREIRA, D.M.; MIYAJI, E.N.; SILVA, D.A.; AREAS, A.P.; AIRES, K.A.; LEITE, L.C.; HO, P.L.; OLIVEIRA, M.L. Nasal immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing the Pneumococcal Surface Protein A: induction of antibodies, complement deposition and partial protection against *Streptococcus pneumoniae* challenge. **Microbes and infection**, v. 10, n. 5, p. 481-488, 2008.

CHAO, Y.; MARKS, L.R.; PETTIGREW, M.M.; HAKANSSON, A.P. *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. **Frontiers in Cell Infection and Microbiology**, v. 4, n., p. 194, 2014.

CRONEY, C.M.; NAHM, M.H.; JUHN, S.K.; BRILES, D.E.; CRAIN, M.J. Invasive and noninvasive *Streptococcus pneumoniae* capsule and surface protein diversity following the use of a conjugate vaccine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 11, p. 1711-1718, 2013.

CUNDELL, D.R.; WEISER, J.N.; SHEN, J.; YOUNG, A.; TUOMANEN, E.I. Relationship between colonial morphology and adherence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 63, n., p. 757-761, 1995.

DANIELS, C.C.; COAN, P.; KING, J.; HALE, J.; BENTON, K.A.; BRILES, D.E.; HOLLINGSHEAD, S.K. The proline-rich region of pneumococcal surface proteins A and C contains surface-accessible epitopes common to all pneumococci and elicits antibody-mediated protection against sepsis. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 2163-2172, 2010.

DARRIEUX, M.; MIYAJI, E.N.; FERREIRA, D.M.; LOPES, L.M.; LOPES, A.P.; REN, B.; BRILES, D.E.; HOLLINGSHEAD, S.K.; LEITE, L.C. Fusion proteins containing family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that correlates with antibody-mediated enhancement of complement deposition. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 12, p. 5930-5938, 2007.

DARRIEUX, M.; MORENO, A.T.; FERREIRA, D.M.; PIMENTA, F.C.; DE ANDRADE, A.L.; LOPES, A.P.; LEITE, L.C.; MIYAJI, E.N. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **Journal of medical microbiology**, v. 57, n. Pt 3, p. 273-278, 2008.

DARRIEUX, M.; GOULART, C.; BRILES, D.; LEITE, L.C. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. **Critical Review in Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 190-200, 2015.

DENOEL, P.; PHILIPP, M.T.; DOYLE, L.; MARTIN, D.; CARLETTI, G.; POOLMAN, J.T. A protein-based pneumococcal vaccine protects rhesus macaques from pneumonia after experimental infection with *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v. 29, n. 33, p. 5495-5501, 2011.

DOMENECH, M.; RUIZ, S.; MOSCOSO, M.; GARCIA, E. In vitro biofilm development of *Streptococcus pneumoniae* and formation of choline-binding protein-DNA complexes. **Environmental Microbiology Reports**, v. 7, n. 5, p. 715-727, 2015.

DONKOR, E.S. Understanding the pneumococcus: transmission and evolution. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n.1, p. 7, 2013.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

FERREIRA, D.M.; AREAS, A.P.; DARRIEUX, M.; LEITE, L.C.; MIYAJI, E.N. DNA vaccines based on genetically detoxified derivatives of pneumolysin fail to protect mice against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 46, n. 2, p. 291-297, 2006a.

FERREIRA, D.M.; MIYAJI, E.N.; OLIVEIRA, M.L.; DARRIEUX, M.; AREAS, A.P.; HO, P.L.; LEITE, L.C. DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein. **Journal of medical microbiology**, v. 55, n. Pt 4, p. 375-378, 2006b.

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. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 3, p. 499-505, 2008.

FERREIRA, D.M.; DARRIEUX, M.; SILVA, D.A.; LEITE, L.C.; FERREIRA, J.M., JR.; HO, P.L.; MIYAJI, E.N.; OLIVEIRA, M.L. Characterization of protective mucosal and systemic immune responses elicited by pneumococcal surface protein PspA and PspC nasal vaccines against a respiratory pneumococcal challenge in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 5, p. 636-645, 2009.

FERREIRA, D.M.; OLIVEIRA, M.L.; MORENO, A.T.; HO, P.L.; BRILES, D.E.; MIYAJI, E.N. Protection against nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 6, p. 205-213, 2010.

GENO, K.A.; GILBERT, G.L.; SONG, J.Y.; SKOVSTED, I.C.; KLUGMAN, K.P.; JONES, C.; KONRADSEN, H.B.; NAHM, M.H. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. **Clinical and Microbiology Review**, v. 28, n. 3, p. 871-899, 2015.

GHAFFAR, F.; BARTON, T.; LOZANO, J.; MUNIZ, L.S.; HICKS, P.; GAN, V.; AHMAD, N.; MCCracken, G.H., JR. Effect of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in the first 2 years of life. **Clinical infectious diseases**, v. 39, n. 7, p. 930-938, 2004.

GHAFFAR, F. The safety of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 4, n. 4, p. 631-636, 2005.

GODFROID, F.; HERMAND, P.; VERLANT, V.; DENOEL, P.; POOLMAN, J.T. Preclinical evaluation of the Pht proteins as potential cross-protective pneumococcal vaccine antigens. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 238-245, 2011.

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*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1304-1312, 2005.

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.

GOULART, C.; DA SILVA, T.R.; RODRIGUEZ, D.; POLITANO, W.R.; LEITE, L.C.; DARRIEUX, M. Characterization of protective immune responses induced by pneumococcal surface protein A in fusion with pneumolysin derivatives. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59605, 2013.

GRAY, B.M.; CONVERSE, G.M., 3RD; HUHTA, N.; JOHNSTON, R.B., JR.; PICHICHERO, M.E.; SCHIFFMAN, G.; DILLON, H.C., JR. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: antibody response to nasopharyngeal carriage of types 3, 19, and 23. **Journal of Infectious Disease**, v. 144, n. 4, p. 312-318, 1981.

HAKANSSON, A.; KIDD, A.; WADELL, G.; SABHARWAL, H.; SVANBORG, C. Adenovirus infection enhances in vitro adherence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 7, p. 2707-2714, 1994.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 7-10, 2005.

HANSEN, J.; BLACK, S.; SHINEFIELD, H.; CHERIAN, T.; BENSON, J.; FIREMAN, B.; LEWIS, E.; RAY, P.; LEE, J. Effectiveness of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children younger than 5 years of age for prevention of pneumonia: updated analysis using World Health Organization standardized interpretation of chest radiographs. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 25, n. 9, p. 779-781, 2006.

HAUSDORFF, W.P.; SIBER, G.; PARADISO, P.R. Geographical differences in invasive pneumococcal disease rates and serotype frequency in young children. **Lancet**, v. 357, n. 9260, p. 950-952, 2001.

HENRIQUES-NORMARK, B.; NORMARK, S. Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. **Experimental cell research**, v. 316, n. 8, p. 1408-1414, 2010.

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. **Journal of Infectious Disease**, v. 196, n. 9, p. 1346-1354, 2007.

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

HOULDSWORTH, S.; ANDREW, P.W.; MITCHELL, T.J. Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1501-1503, 1994.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 271, n. 3, p. 559-564, 2000.

IGARASHI, K.; ITO, K.; KASHIWAGI, K. Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 271-278, 2001.

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

JOHNSTON, R.B., JR. The host response to invasion by *Streptococcus pneumoniae*: protection and the pathogenesis to tissue damage. **Reviews in Infectious Disease**, v. 3, n. 2, p. 282-288, 1981.

JULIE SKINNER, L.I., MICHAEL WINTERS, JOHN MACNAIR, WALTER MANGER, HARI PUJAR, JEFFREY BLUE, JOSEPH ANTONELLO, JON HEINRICHS, MICHAEL CAULFIELD. Preclinical evaluation of a 15-valent pneumococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine in infant rhesus monkeys. **The Journal of Immunology**, v., n., p., 2010.

KAMTCHOUA, T.; BOLOGA, M.; HOPFER, R.; NEVEU, D.; HU, B.; SHENG, X.; CORDE, N.; POUZET, C.; ZIMMERMANN, G.; GURUNATHAN, S. Safety and immunogenicity of the pneumococcal pneumolysin derivative PlyD1 in a single-antigen protein vaccine candidate in adults. **Vaccine**, v. 31, n. 2, p. 327-333, 2013.

KANCLERSKI, K.; MOLLBY, R. Production and purification of *Streptococcus pneumoniae* hemolysin (pneumolysin). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 222-225, 1987.

KASHIWAGI, K.; PISTOCCHI, R.; SHIBUYA, S.; SUGIYAMA, S.; MORIKAWA, K.; IGARASHI, K. Spermidine-preferential uptake system in *Escherichia coli*. Identification of amino acids involved in polyamine binding in PotD protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 21, p. 12205-12208, 1996.

KELLER, L.E.; ROBINSON, D.A.; MCDANIEL, L.S. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and Pathogenesis. **MBio**, v. 7, n. 2, p. e01792, 2016.

KELLY, D.F.; MOXON, E.R.; POLLARD, A.J. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 163-174, 2004.

KHAN, M.N.; PICHICHERO, M.E. The host immune dynamics of pneumococcal colonization: implications for novel vaccine development. **Humam Vaccine Immunotherapy**, v. 10, n. 12, p. 3688-3699, 2014.

KIRKHAM, L.A.; KERR, A.R.; DOUCE, G.R.; PATERSON, G.K.; DILTS, D.A.; LIU, D.F.; MITCHELL, T.J. Construction and immunological characterization of a novel nontoxic protective pneumolysin mutant for use in future pneumococcal vaccines. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 586-593, 2006.

KOURO, T.; TAKATSU, K. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. **International Immunology**, v. 21, n. 12, p. 1303-1309, 2009.

LEINONEN, M.; SAKKINEN, A.; KALLIOKOSKI, R.; LUOTONEN, J.; TIMONEN, M.; MAKELA, P.H. Antibody response to 14-valent pneumococcal capsular polysaccharide vaccine in pre-school age children. **Pediatric Infectious Disease**, v. 5, n. 1, p. 39-44, 1986.

LIU, S.; TOBIAS, R.; MCCLURE, S.; STYBA, G.; SHI, Q.; JACKOWSKI, G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. **Clinical biochemistry**, v. 30, n. 6, p. 455-463, 1997.

LU, J.; SUN, T.; WANG, D.; DONG, Y.; XU, M.; HOU, H.; KONG, F.T.; LIANG, C.; GU, T.; CHEN, P.; SUN, S.; LV, X.; JIANG, C.; KONG, W.; WU, Y. Protective Immune Responses Elicited by Fusion Protein Containing PsaA and PspA Fragments. **Immunology Investigation**, v. 44, n. 5, p. 482-496, 2015.

LU, Y.J.; GROSS, J.; BOGAERT, D.; FINN, A.; BAGRADE, L.; ZHANG, Q.; KOLLS, J.K.; SRIVASTAVA, A.; LUNDGREN, A.; FORTE, S.; THOMPSON, C.M.; HARNEY, K.F.; ANDERSON, P.W.; LIPSITCH, M.; MALLEY, R. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 9, p. e1000159, 2008.

LU, Y.J.; FORTE, S.; THOMPSON, C.M.; ANDERSON, P.W.; MALLEY, R. Protection against Pneumococcal colonization and fatal pneumonia by a trivalent conjugate of a fusion protein with the cell wall polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 2076-2083, 2009.

LUNDGREN, A.; BHUIYAN, T.R.; NOVAK, D.; KAIM, J.; RESKE, A.; LU, Y.J.; QADRI, F.; MALLEY, R. Characterization of Th17 responses to *Streptococcus pneumoniae* in humans: comparisons between adults and children in a developed and a developing country. **Vaccine**, v. 30, n. 26, p. 3897-3907, 2012.

MAHDI, L.K.; OGUNNIYI, A.D.; LEMESSURIER, K.S.; PATON, J.C. Pneumococcal virulence gene expression and host cytokine profiles during pathogenesis of invasive disease. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 646-657, 2008.

MALLEY, R.; LIPSITCH, M.; STACK, A.; SALADINO, R.; FLEISHER, G.; PELTON, S.; THOMPSON, C.; BRILES, D.; ANDERSON, P. Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by capsulated pneumococci. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4870-4873, 2001.

MALLEY, R.; HENNEKE, P.; MORSE, S.C.; CIESLEWICZ, M.J.; LIPSITCH, M.; THOMPSON, C.M.; KURT-JONES, E.; PATON, J.C.; WESSELS, M.R.; GOLENBOCK, D.T. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 4, p. 1966-1971, 2003.

MALLEY, R.; SRIVASTAVA, A.; LIPSITCH, M.; THOMPSON, C.M.; WATKINS, C.; TZIANABOS, A.; ANDERSON, P.W. Antibody-independent, interleukin-17A-mediated, cross-serotype immunity to pneumococci in mice immunized intranasally with the cell wall polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2187-2195, 2006.

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. **Microbial Pathogens**, v. 17, n. 5, p. 323-337, 1994.

MCGINNIS, M.W.; PARKER, Z.M.; WALTER, N.E.; RUTKOVSKY, A.C.; CARTAYA-MARIN, C.; KARATAN, E. Spermidine regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation via transport and signaling pathways. **FEMS Microbiol Letters**, v. 299, n. 2, p. 166-174, 2009.

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. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 2, p. 676-684, 2009.

MIN, X.; ZHANG, X.; WANG, H.; GONG, Y.; LI, M.; XU, W.; YIN, Y.; CAO, J. Protection against pneumococcal infection elicited by immunization with glutamyl tRNA synthetase, polyamine transport protein D and sortase A. **Vaccine**, v. 30, n. 24, p. 3624-3633, 2012.

MITCHELL, T.J.; ANDREW, P.W.; SAUNDERS, F.K.; SMITH, A.N.; BOULNOIS, G.J. Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute-phase protein. **Molecular microbiology**, v. 5, n. 8, p. 1883-1888, 1991.

MOFFITT, K.L.; YADAV, P.; WEINBERGER, D.M.; ANDERSON, P.W.; MALLEY, R. Broad antibody and T cell reactivity induced by a pneumococcal whole-cell vaccine. **Vaccine**, v. 30, n. 29, p. 4316-4322, 2012.

MORENO, A.T.; OLIVEIRA, M.L.; FERREIRA, D.M.; HO, P.L.; DARRIEUX, M.; LEITE, L.C.; FERREIRA, J.M., JR.; PIMENTA, F.C.; ANDRADE, A.L.; MIYAJI, E.N. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 3, p. 439-446, 2010.

MOSCOSO, M.; GARCIA, E.; LOPEZ, R. Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 22, p. 7785-7795, 2006.

NABORS, G.S.; BRAUN, P.A.; HERRMANN, D.J.; HEISE, M.L.; PYLE, D.J.; GRAVENSTEIN, S.; SCHILLING, M.; FERGUSON, L.M.; HOLLINGSHEAD, S.K.; BRILES, D.E.; BECKER, R.S. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. **Vaccine**, v. 18, n. 17, p. 1743-1754, 2000.

NGUYEN, C.T.; KIM, S.Y.; KIM, M.S.; LEE, S.E.; RHEE, J.H. Intranasal immunization with recombinant PspA fused with a flagellin enhances cross-protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 34, p. 5731-5739, 2011.

NOVAK, R.; TUOMANEN, E. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. **Seminars in respiratory infections**, v. 14, n. 3, p. 209-217, 1999.

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.

O'BRIEN KL, S.M., EDWARDS K, KEYSERLING H, THOMS ML, MADORE D. Immunologic priming of young children by pneumococcal glycoprotein conjugate, but not polysaccharide, vaccines. **Pediatric Infectious Disease**, v. 15, n. 5, p. 425-430, 1996.

OGUNNIYI, A.D.; LEMESSURIER, K.S.; GRAHAM, R.M.; WATT, J.M.; BRILES, D.E.; STROEHER, U.H.; PATON, J.C. Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1843-1851, 2007a.

OGUNNIYI, A.D.; GRABOWICZ, M.; BRILES, D.E.; COOK, J.; PATON, J.C. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 1, p. 350-357, 2007b.

OLIVEIRA, M.L.; MIYAJI, E.N.; FERREIRA, D.M.; MORENO, A.T.; FERREIRA, P.C.; LIMA, F.A.; SANTOS, F.L.; SAKAUCHI, M.A.; TAKATA, C.S.; HIGASHI, H.G.; RAW, I.; KUBRUSLY, F.S.; HO, P.L. Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10863, 2010.

PALANIAPPAN, R.; SINGH, S.; SINGH, U.P.; SAKTHIVEL, S.K.; ADES, E.W.; BRILES, D.E.; HOLLINGSHEAD, S.K.; PATON, J.C.; SAMPSON, J.S.; LILLARD, J.W., JR. Differential PsaA-, PspA-, PspC-, and PdB-specific immune responses in a mouse model of pneumococcal carriage. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1006-1013, 2005.

PARSEK, M.R.; SINGH, P.K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n., p. 677-701, 2003.

PATEL, C.N.; WORTHAM, B.W.; LINES, J.L.; FETHERSTON, J.D.; PERRY, R.D.; OLIVEIRA, M.A. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 7, p. 2355-2363, 2006.

PATON, J.C.; FERRANTE, A. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1212-1216, 1983.

PATON, J.C.; LOCK, R.A.; HANSMAN, D.J. Effect of immunization with pneumolysin on survival time of mice challenged with *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 40, n. 2, p. 548-552, 1983.

PATON, J.C.; LOCK, R.A.; LEE, C.J.; LI, J.P.; BERRY, A.M.; MITCHELL, T.J.; ANDREW, P.W.; HANSMAN, D.; BOULNOIS, G.J. Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 7, p. 2297-2304, 1991.

PERCIANI, C.T.; BARAZZONE, G.C.; GOULART, C.; CARVALHO, E.; CABRERA-CRESPO, J.; GONCALVES, V.M.; LEITE, L.C.; TANIZAKI, M.M. Conjugation of polysaccharide 6B from *Streptococcus pneumoniae* with pneumococcal surface protein A: PspA conformation and its effect on the immune response. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 6, p. 858-866, 2013.

PIMENTA, F.C.; RIBEIRO-DIAS, F.; BRANDILEONE, M.C.; MIYAJI, E.N.; LEITE, L.C.; SGAMBATTI DE ANDRADE, A.L. Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during an ongoing surveillance study of children in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2838-2843, 2006.

PLOTKOWSKI, M.C.; PUCHELLE, E.; BECK, G.; JACQUOT, J.; HANNOUN, C. Adherence of type I *Streptococcus pneumoniae* to tracheal epithelium of mice infected with influenza A/PR8 virus. **The American review of respiratory disease**, v. 134, n. 5, p. 1040-1044, 1986.

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

POLISSI, A.; PONTIGGIA, A.; FEGER, G.; ALTIERI, M.; MOTTL, H.; FERRARI, L.; SIMON, D. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 5620-5629, 1998.

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

PRICE, K.E.; GREENE, N.G.; CAMILLI, A. Export requirements of pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 14, p. 3651-3660, 2012.

PRYMULA, R.; PAZDIORA, P.; TRASKINE, M.; RUGGEBERG, J.U.; BORYS, D. Safety and immunogenicity of an investigational vaccine containing two common pneumococcal proteins in toddlers: a phase II randomized clinical trial. **Vaccine**, v. 32, n. 25, p. 3025-3034, 2014.

RAMOS, C.R.; ABREU, P.A.; NASCIMENTO, A.L.; HO, P.L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 37, n. 8, p. 1103-1109, 2004.

REN, B.; SZALAI, A.J.; THOMAS, O.; HOLLINGSHEAD, S.K.; BRILES, D.E. Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 75-85, 2003.

REN, B.; SZALAI, A.J.; HOLLINGSHEAD, S.K.; BRILES, D.E. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 114-122, 2004.

REVAI, K.; MAMIDI, D.; CHONMAITREE, T. Association of nasopharyngeal bacterial colonization during upper respiratory tract infection and the development of acute otitis media. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 4, p. e34-37, 2008.

ROCHE, A.M.; RICHARD, A.L.; RAHKOLA, J.T.; JANOFF, E.N.; WEISER, J.N. Antibody blocks acquisition of bacterial colonization through agglutination. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 1, p. 176-185, 2015.

ROCHE, H.; HAKANSSON, A.; HOLLINGSHEAD, S.K.; BRILES, D.E. Regions of PspA/EF3296 best able to elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* in a murine infection model. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1033-1041, 2003.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; ABREU-DE-OLIVEIRA, J.T.; DE-AZEVEDO-MOREIRA, R.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 25, n. 8, p. 823-826, 1992.

ROSSJOHN, J.; GILBERT, R.J.; CRANE, D.; MORGAN, P.J.; MITCHELL, T.J.; ROWE, A.J.; ANDREW, P.W.; PATON, J.C.; TWETEN, R.K.; PARKER, M.W. The

molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**, v. 284, n. 2, p. 449-461, 1998.

RUBINS, J.B.; DUANE, P.G.; CHARBONEAU, D.; JANOFF, E.N. Toxicity of pneumolysin to pulmonary endothelial cells in vitro. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 5, p. 1740-1746, 1992.

S ROMERO-STEINER; D LIBUTTI; L B PAIS; J DYKES; P ANDERSON; J C WHITIN; KEYSERLING, H.L.; CARLONE, G.M. Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. **Clinical and vaccine immunology**, v. 4, n. 4, p. 8, 1997.

SALHA, D.; SZETO, J.; MYERS, L.; CLAUS, C.; SHEUNG, A.; TANG, M.; LJUTIC, B.; HANWELL, D.; OGILVIE, K.; MING, M.; MESSHAM, B.; VAN DEN DOBBELSTEEN, G.; HOPFER, R.; OCHS, M.M.; GALLICHAN, S. Neutralizing antibodies elicited by a novel detoxified pneumolysin derivative, PlyD1, provide protection against both pneumococcal infection and lung injury. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 2212-2220, 2012.

SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual** 3. ed. Cold Spring Harbor NY.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. 4 v.

SHAH, P.; MARQUART, M.; QUIN, L.R.; SWIATLO, E. Cellular location of polyamine transport protein PotD in *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS microbiology letters**, v. 261, n. 2, p. 235-237, 2006.

SHAH, P.; SWIATLO, E. Immunization with polyamine transport protein PotD protects mice against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 10, p. 5888-5892, 2006.

SHAH, P.; ROMERO, D.G.; SWIATLO, E. Role of polyamine transport in *Streptococcus pneumoniae* response to physiological stress and murine septicemia. **Microbial Pathogens**, v. 45, n. 3, p. 167-172, 2008.

SHAH, P.; SWIATLO, E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 4-16, 2008.

SHAH, P.; BRILES, D.E.; KING, J.; HALE, Y.; SWIATLO, E. Mucosal immunization with polyamine transport protein D (PotD) protects mice against nasopharyngeal colonization with *Streptococcus pneumoniae*. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 4, p. 403-409, 2009.

SHAH, P.; NANDURI, B.; SWIATLO, E.; MA, Y.; PENDARVIS, K. Polyamine biosynthesis and transport mechanisms are crucial for fitness and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 2, p. 504-515, 2011.

SHAK, J.R.; LUDEWICK, H.P.; HOWERY, K.E.; SAKAI, F.; YI, H.; HARVEY, R.M.; PATON, J.C.; KLUGMAN, K.P.; VIDAL, J.E. Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. **MBio**, v. 4, n. 5, p. e00655-00613, 2013.

SHAK, J.R.; VIDAL, J.E.; KLUGMAN, K.P. Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 129-135, 2013.

SINGH, R.; SINGH, S.; SHARMA, P.K.; SINGH, U.P.; BRILES, D.E.; HOLLINGSHEAD, S.K.; LILLARD, J.W., JR. Helper T cell epitope-mapping reveals MHC-peptide binding affinities that correlate with T helper cell responses to pneumococcal surface protein A. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9432, 2010.

SKINNER, J.M.; INDRAWATI, L.; CANNON, J.; BLUE, J.; WINTERS, M.; MACNAIR, J.; PUJAR, N.; MANGER, W.; ZHANG, Y.; ANTONELLO, J.; SHIVER, J.; CAULFIELD, M.; HEINRICHS, J.H. Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. **Vaccine**, v. 29, n. 48, p. 8870-8876, 2011.

SLEEMAN, K.L.; GRIFFITHS, D.; SHACKLEY, F.; DIGGLE, L.; GUPTA, S.; MAIDEN, M.C.; MOXON, E.R.; CROOK, D.W.; PETO, T.E. Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. **Journal of Infectious Disease**, v. 194, n. 5, p. 682-688, 2006.

TAI, S.S. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. **Critical Review in Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 139-153, 2006.

TUOMANEN, E.I.; AUSTRIAN, R.; MASURE, H.R. Pathogenesis of pneumococcal infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 19, p. 1280-1284, 1995.

TUOMANEN, E.I. The biology of pneumococcal infection. **Pediatric research**, v. 42, n. 3, p. 253-258, 1997.

VAN GINKEL, F.W.; MCGHEE, J.R.; WATT, J.M.; CAMPOS-TORRES, A.; PARISH, L.A.; BRILES, D.E. Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 24, p. 14363-14367, 2003.

VELA CORAL, M.C.; FONSECA, N.; CASTANEDA, E.; DI FABIO, J.L.; HOLLINGSHEAD, S.K.; BRILES, D.E. Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. **Emergent Infectious Disease**, v. 7, n. 5, p. 832-836, 2001.

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. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 28, n. 4 Suppl, p. S66-76, 2009.

VIDAL, J.E.; LUDEWICK, H.P.; KUNKEL, R.M.; ZAHNER, D.; KLUGMAN, K.P. The LuxS-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strain D39. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 10, p. 4050-4060, 2011.

VIROLAINEN, A.; RUSSELL, W.; CRAIN, M.J.; RAPOLA, S.; KAYHTY, H.; BRILES, D.E. Human antibodies to pneumococcal surface protein A in health and disease. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 19, n. 2, p. 134-138, 2000.

VITHARSSON, G.; JONSDOTTIR, I.; JONSSON, S.; VALDIMARSSON, H. Opsonization and antibodies to capsular and cell wall polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Infectious Disease**, v. 170, n. 3, p. 592-599, 1994.

WARE, D.; JIANG, Y.; LIN, W.; SWIATLO, E. Involvement of *potD* in *Streptococcus pneumoniae* polyamine transport and pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 352-361, 2006.

WARE, D., J. WATT, AND E. SWIATLO. Utilization of putrescine by *Streptococcus pneumoniae* growing in choline-limited medium. **Journal of Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 398-405, 2005.

WEISER, J.N.; AUSTRIAN, R.; SREENIVASAN, P.K.; MASURE, H.R. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 6, p. 2582-2589, 1994.

WEISER, J.N.; KAPOOR, M. Effect of intrastain variation in the amount of capsular polysaccharide on genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*: implications for virulence studies of encapsulated strains. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, p. 3690-3692, 1999.

YADAV, M.K.; CHAE, S.W.; SONG, J.J. In Vitro *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Formation and In Vivo Middle Ear Mucosal Biofilm in a Rat Model of Acute Otitis

Induced by *S. pneumoniae*. **Clinical and Experimental Otorhinolaryngology**, v. 5, n. 3, p. 139-144, 2012.

YOTHER, J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. **Annual Review in Microbiology**, v. 65, n., p. 563-581, 2011.

ZHANG, X.; ZHANG, Y.; LIU, J.; LIU, H. PotD protein stimulates biofilm formation by *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 7, p. 1099-1106, 2013.

APÊNDICE – Artigos Publicados

I. **Converso TR**, Goulart C, Rodriguez D, Darrieux M, Leite LCC. Systemic immunization with rPotD reduces *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonization in mice. **Vaccine**. 2016

II. G.O. André, W.R. Politano , S. Mirza , **T.R. Converso**, L.F.C. Ferraz, L.C.C. Leite, M. Darrieux. Combined effects of lactoferrin and lysozyme on *Streptococcus pneumoniae* killing. **Microbial Pathogenesis**. V. 89 p. 7-17. 2015.