

**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

## 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- $\gamma$ , 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- $\gamma$ , 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.

## 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*

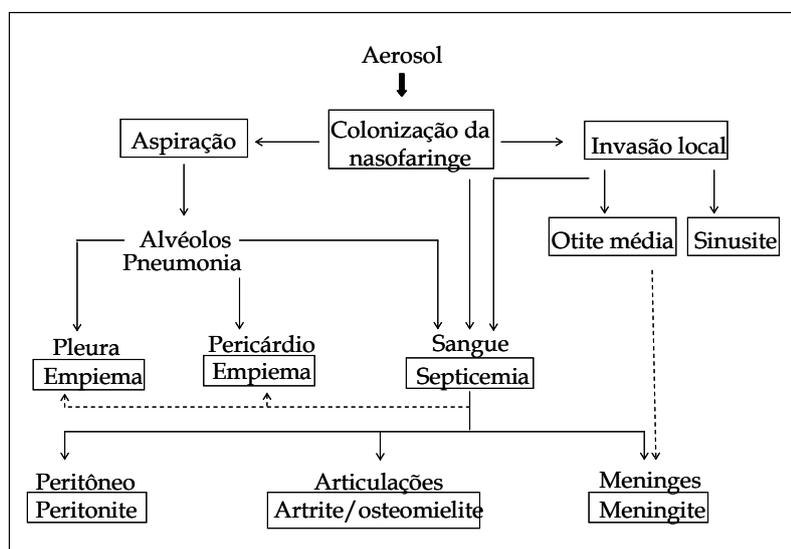
A colonização da nasofaringe corresponde ao primeiro evento na patogênese do pneumococo, e precede todas as doenças causadas pela bactéria. A colonização ocorre durante a infância e persiste assintomaticamente em indivíduos saudáveis na idade adulta (CHAO et al., 2014; GRAY et al., 1981). O pneumococo 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 resume 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 CRM<sub>197</sub>. A Prevnar mostrou-se eficaz contra doença invasiva em crianças com menos de 2 anos (GHAFAR, 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 (GHAFAR 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 CRM<sub>197</sub> (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 CRM<sub>197</sub> (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).

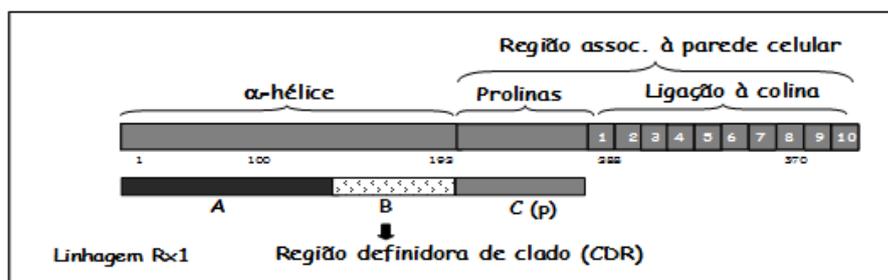
Além das limitações apontadas das vacinas baseadas em polissacarídeos capsulares, estudos recentes tem descrito um aumento na prevalência de isolados de pneumococo sem cápsula (NESP) na mucosa de indivíduos colonizados, bem como em portadores de doença não-invasiva e invasiva (CRONEY et al., 2013; KELLER; 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).

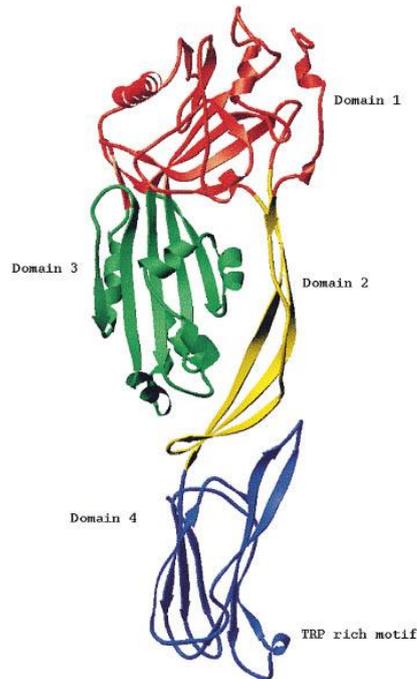
PspA inibe a deposição de C3b do sistema complemento na superfície da bactéria. Estudos mostram que a PspA tem a capacidade de inibir a formação de C3 convertase pela via alternativa, inibindo a opsonização por C3b, colaborando assim para a evasão da fagocitose pela bactéria (REN et al., 2004). Anticorpos 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  $\beta$  (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 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , 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- $\alpha$  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).



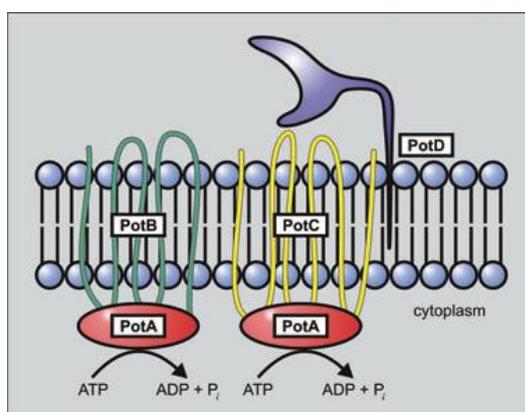
**Figura 3 - Modelo da estrutura da PLY.** A proteína é composta por 4 domínios ricos em folhas- $\beta$ , o domínio 4 está relacionado com sua atividade citolítica e ativação de complemento. Fonte: Rossjohn et al, 1998.

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 significante 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.

## 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- $\gamma$  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 Imunopreveníveis**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ldb2012/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 HEINRICH, 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.; CARTAYAMARIN, 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.; HEINRICH, 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.