RAFAELLA OLIVEIRA TOSTES

Avaliação da eficácia do antígeno PspA (*Pneumococcal surface protein* A) em modelo de co-colonização com diferentes linhagens de *Streptococcus pneumoniae*

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

São Paulo 2016

RAFAELLA OLIVEIRA TOSTES

Avaliação da eficácia do antígeno PspA (*Pneumococcal surface protein* A) em modelo de co-colonização com diferentes linhagens de *Streptococcus pneumoniae*

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Eliane Namie Miyaji

Versão original

São Paulo 2016

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

© reprodução total

Tostes, Rafaella Oliveira.

Avaliação da eficácia do antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) em modelo de co-colonização com diferentes linhagens de *Streptococcus pneumoniae* / Rafaella Oliveira Tostes. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Eliane Namie Miyaji.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Antígenos vacinais.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the efficacy of PspA (Pneumococcal surface protein A) in a co-colonization model with different strains of *Streptococcus pneumoniae*.

1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Vacina 3. PspA 4. Proteína recombinante 5. Co-colonização 6. Antígeno I. Miyaji, Profa. Dra. Eliane Namie II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB017/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

| Candidato(a): | Rafaella Oliveira Tostes. | | | |
|---|---|--|--|--|
| Título da Dissertação: | Avaliação da eficácia do antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) em modelo de co-colonização com diferentes linhagens de <i>Streptococcus pneumoniae</i> . | | | |
| Orientador(a): | Profa. Dra. Eliane Namie Miyaji. | | | |
| A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a//// | | | | |

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

| Examinador(a): | Assinatura: Nome: Instituição: |
|----------------|--------------------------------------|
| Examinador(a): | Assinatura: Nome: Instituição: |
| Presidente: | Assinatura: Nome: Instituição: |



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN Av. 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 "Avaliação da eficácia do antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) em modelo de co-colonização com diferentes linhagens de *Streptococcus pneumoniae*", **protocolo nº 1158/13**, sob a responsabilidade de Eliane Namie Miyaji e Rafaella Oliveira Tostes – 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 13/11/2013.

This is to certify that the proposal Evaluation of the efficacy of the antigen PspA (Pneumococcal surface protein A) in a co-colonization model with different strains of Streptococcus pneumoniae, protocol n° 1158/13, under the responsibility of Eliane Namie Miyaji and Rafaella Oliveira Tostes, – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 11/13/2013. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

| Vigência do Projeto: 01/2014 - 12/2018 | N° de animais/espécie |
|---|---|
| Centro de Biotecnologia | 360 camundongos C57BL/6 - 5-7sem - 18-22g (F) |

São Paulo, 11 de fevereiro de 2014

Dr. Marcelo L. Santoro Coordenador da CEUAIB

Av Vital Brasil 1500 - Casa 82 05503-900 São Paulo SP T +55 11 3723-2132 ceuaib@butantan.gov.br www.butantan.gov.br

і_b butantan

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIB) INSTITUTO BUTANTAN

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da eficácia do antígeno PspA (Pneumococcal surface protein A) em modelo de co-colonização com diferentes linhagens de *Streptococcus pneumoniae*", **protocolo nº 1158/13**, sob a responsabilidade de Eliane Namie Miyaji e Rafaella Oliveira Tostes – 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 16/9/2015.

This is to certify that the proposal "Evaluation of the efficacy of the antigen PspA (Pneumococcal surface protein A) in a co-colonization model with different strains of *Streptococcus pneumoniae*", **protocol** n^o **1158/13**, under the responsibility of Eliane Namie Miyaji and Rafaella Oliveira Tostes – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 9/16/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

| Vigência do Projeto: 01/2014 - 12/2018 | N° de animais/espécie | Observação |
|---|--------------------------------------|--------------------|
| Centro de Biotecnologia | 150 Camundongos C57BL/6 - 5-7sem (F) | Aditivo de animais |

São Paulo, 18 de setembro de 2015

Dr. José Ricardo Jensen Coordenador da CEUAIB

"Dedico esta dissertação às pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento da ciência visando o bem da humanidade, e às pessoas que eu amo e que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos."

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Eliane Namie Miyaji, por toda a dedicação, paciência, e por ter acreditado e depositado sua confiança em mim ao longo desses dois anos. Muito obrigada pela amizade e por todos os ensinamentos, pelo seu exemplo de ética e profissionalismo, que contribuíram não só para o meu conhecimento científico, mas também para o meu crescimento como pessoa.

À Dra. Maria Leonor Sarno de Oliveira, pelos conselhos e por estar sempre disposta a ajudar. Sua colaboração e experiência foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores, Dra. Alessandra S. Schanoski, Dra. Josefa B. da Silva e Dr. Enéas de Carvalho, pelo apoio, incentivo, por me auxiliar com novas técnicas e aprimorar os resultados do meu trabalho.

Ao Dr. Paulo Lee Ho pelo incentivo e valiosas contribuições ao trabalho.

Ao Jorge, pelo carinho e disposição para me auxiliar nos experimentos de citometria de fluxo.

Aos meus amigos de laboratório, Júlia, Marcela, Stefanni, Fabiana, Rubia e Tasson, por compartilharem seus conhecimentos, pelos conselhos, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelas risadas infinitas, pelos *happy hours*. Vocês foram essenciais nesta etapa da minha vida!

Às funcionárias do laboratório, Aline, Nidia e Vera, pela amizade e carinho. Obrigada pelo suporte, vocês foram muito importantes para o progresso deste projeto!

Aos meus pais, Maria e André, que sempre me incentivaram, mostrando que esse caminho deveria ser seguido sem medo, independente dos obstáculos, e que com amor incondicional nunca mediram esforços para que eu chegasse até aqui. À minha irmã, Andréa, que apesar da distância sempre esteve ao meu lado, me apoiando e sendo uma grande amiga.

Ao Danilo, pelo apoio incondicional, por ser meu melhor amigo. Obrigada pelo companheirismo, dedicação e amor, e por sempre me dar forças para alcançar os meus objetivos.

Aos familiares, em especial à minha avó Geraldina, ao meu avô Olavo e à minha tia Joana, que me apoiaram em todos os momentos, acreditando e torcendo pelo meu sucesso.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPESP e Fundação Butantan, pelo auxílio à pesquisa, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho, muito obrigada!

"Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade." Marie Curie

RESUMO

Tostes RO. Avaliação da eficácia do antígeno PspA (*Pneumococcal surface protein* A) em modelo de co-colonização com diferentes linhagens de *Streptococcus pneumoniae*. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

Streptococcus pneumoniae é o patógeno causador de diversas doenças com elevada mortalidade e morbidade, como meningite, bacteremia e pneumonia. As vacinas disponíveis baseiam-se na resposta contra o polissacarídeo capsular (PS), porém possuem elevado custo e cobertura limitada aos sorotipos vacinais. Um forte candidato vacinal é a proteína PspA (Pneumococcal surface protein A) que apresenta variabilidade em diferentes isolados. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da imunização nasal com PspAs recombinantes de família 1 (rPspA1 e rPspA2) e de família 2 (rPspA3, rPspA4 e rPspA5) em um modelo de co-colonização da nasofaringe de camundongos, utilizando isolados que expressam diferentes PspAs (PspA1 ao PspA4). Esse modelo visa avaliar a eficácia da vacinação frente à exposição a diferentes pneumococos, uma situação bastante comum, especialmente em crianças. Foram realizados experimentos para construção de linhagens de pneumococos expressando PspA1 ou PspA4 em um mesmo background genético a partir do isolado TIGR4. No entanto, resultados de PCR e western blot mostraram, após várias tentativas, o insucesso de construção dessas linhagens. Camundongos C57BL/6 foram então imunizados com rPspA1, rPspA2, rPspA3, rPspA4 ou rPspA5 por via nasal utilizando a vacina celular pertussis (wP) como adjuvante. Após três semanas, os camundongos foram desafiados com uma mistura dos isolados clínicos 491/00 (sorotipo 6B, PspA1) e 472/96 (sorotipo 6B, PspA4, resistente a trimetoprim) e as bactérias foram recuperadas a partir de lavagens nasais em placas de ágarsangue. Experimentos de desafio com a mistura dos isolados de sorotipo 6B (PspA3), resistente à espectinomicina) e do sorotipo 23F (PspA2) também foram realizados. Os resultados do desafio com a mistura dos isolados de sorotipo 6B indicaram que apenas os animais imunizados com rPspA1 mostraram uma redução estatisticamente significativa na colonização com o isolado expressando PspA1 quando comparado ao grupo controle imunizado com o adjuvante wP, e apenas os animais imunizados com rPspA4 mostraram redução do isolado que expressa PspA4 guando comparado com o grupo controle imunizado com o adjuvante wP. Essas análises mostraram que, aparentemente, rPspA1 e rPspA4 são os antígenos com maior potencial de proteção contra os dois isolados. Sendo assim, foi testada a mistura dos dois antígenos (rPspA1+rPspA4) ou uma dose de rPspA1 seguida de uma dose de rPspA4 (rPspA1/rPspA4), e tanto a imunização com rPspA1+rPspA4 como a imunização com rPspA1/rPspA4 diminuíram a colonização pelos dois isolados de sorotipo 6B. Os experimentos com o desafio com os sorotipos 6B e 23F mostraram redução estatisticamente significativa na colonização com o sorotipo 6B (PspA3) nos grupos imunizados com rPspA4 e rPspA1+rPspA4 quando comparados com o grupo de controle salina. Diferença estatística também foi encontrada na colonização com o sorotipo 23F (PspA2) nos grupos imunizados com rPspA1 e rPspA4 em relação ao grupo controle salina. Esses dados indicam que nesse modelo, os antígenos rPspA1 e rPspA4 também seriam adequados no controle da colonização por pneumococos de diferentes sorotipos expressando PspAs de família 1 e 2. Além disso, nenhuma das formulações vacinais testadas levou a um aumento

exacerbado de colonização de um isolado em relação ao outro, mostrando que a estratégia vacinal não estaria favorecendo a substituição de isolados de pneumococo. Os experimentos deste projeto avaliaram, portanto, a colonização com misturas de isolados dos sorotipos 6B e 23F e expressando PspA1, PspA2, PspA3 ou PspA4, mostrando uma análise ampla da cobertura vacinal contra pneumococo das diferentes formulações contendo as variantes do antígeno PspA e a importância desse antígeno para o desenvolvimento de uma nova vacina.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Vacina. PspA. Proteína recombinante. Co-colonização. Antígeno.

ABSTRACT

Tostes RO. Evaluation of the efficacy of PspA (Pneumococcal surface protein A) in a co-colonization model with different strains of *Streptococcus pneumoniae*. [dissertation (Master`s program in Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Streptococcus pneumoniae is the cause of several diseases with high mortality and morbidity, such as meningitis, bacteremia and pneumonia. The available vaccines are based on the response against the capsular polysaccharide (PS), but they have a high cost and coverage restricted to the vaccine serotypes. A promising vaccine candidate is the PspA protein (Pneumococcal surface protein A), which shows variability in different isolates. The purpose of this study was to evaluate the efficacy of nasal immunization with recombinant PspAs from family 1 (rPspA1 and rPspA2) and from family 2 (rPspA3, rPspA4 and rPspA5) in a model of co-colonization of the mouse nasopharynx, using isolates expressing different PspAs (PspA1 to PspA4). This model aims to analyze the effectiveness of vaccination upon exposure to different pneumococci, a common situation, especially in children. Experiments were done for the construction of pneumococcal strains expressing PspA1 or PspA4 in the same genetic background using the TIGR4 strain. However, PCR and western blot results showed, after several attempts, that the construction of these strains failed. C57BL/6 mice were then immunized intranasally with rPspA1, rPspA2, rPspA3, rPspA4 or rPspA5 using the cellular pertussis vaccine (wP) as adjuvant. After three weeks, mice were challenged with a mixture of clinical isolates 491/00 (serotype 6B, PspA1) and 472/96 (serotype 6B, PspA4, trimethoprim-resistant) and bacteria were recovered from nasal washes on blood agar plates. Challenge experiments with a mixture of isolates of serotype 6B (PspA3, resistant to spectinomycin) and serotype 23F (PspA2) were also performed. The results of the challenge with the mixture of isolates of serotype 6B indicated that only animals immunized with rPspA1 showed a statistically significant reduction in colonization with the isolate expressing PspA1 compared to the control group immunized with the adjuvant wP and only animals immunized with rPspA4 showed reduction of the isolate expressing PspA4 when compared with the control group immunized with the adjuvant wP. These analyses showed that apparently rPspA1 and rPspA4 are antigens with the greatest potential for protection against both strains. Therefore, the mixture of the two antigens (rPspA1 + rPspA4) or a dose of rPspA1 followed by a dose of rPspA4 (rPspA1 / rPspA4) were tested, and both immunization with rPspA1 + rPspA4 and with rPspA1 / rPspA4 decreased colonization of the two serotype 6B isolates. The experiments with the challenge with serotypes 6B and 23F showed statistically significant reduction in colonization with serotype 6B (PspA3) in the groups immunized with rPspA4 and rPspA1 + rPspA4 when compared to the saline control group. Differences were also found in colonization with serotype 23F (PspA2) in the groups immunized with rPspA1 and rPspA4 compared to the saline control group. These data indicate that in rPspA1 and rPspA4 also appear to be this model. suitable to control the colonization by pneumococci of different serotypes expressing PspAs from family 1 and family 2. Furthermore, none of the tested vaccine formulations led to a pronounced increase in colonization of one isolate over the other, showing that the vaccine strategy would not favor the replacement of pneumococcal isolates. The experiments in this project assessed colonization with mixtures of isolates of

serotypes 6B and 23F, expressing PspA1, PspA2, PspA3 or PspA4, showing a wide vaccination coverage analysis of different formulations containing the PspA variants against pneumococcus and the importance of this antigen to the development of a new vaccine.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. Vaccine. PspA. Recombinant protein. Co-colonization. Antigen.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1- Taxa de mortalidade causada por doenças pneumocócicas. Representada |
|--|
| em mortes por 100.000 crianças HIV negativas menores de cinco anos de idade |
| (O'Brien et al., 2009) |
| Figura 2- Causas de morte no grupo de crianças menores de 5 anos de idade em |
| países de baixa renda22 |
| Figura 3- Cobertura vacinal no mundo em 2014 |
| Figura 4- Introdução ou o planejamento de introdução para 2016 da vacina |
| pneumocócica conjugada em todo o mundo27 |
| Figura 5- Representação esquemática da superfície de pneumococo. (Adaptado |
| Briles et al., 2000) |
| Figura 6- Representação esquemática dos domínios contidos nas proteínas PspA. |
| (Adaptado de Moreno et al., 2010) |
| Figura 7- Classificação de PspA em famílias e clados |
| Figura 8- Esquema dos domínios estruturais dos fragmentos <i>pspA</i> |
| Figura 9- Esquema de imunização e desafio via nasal de camundongos42 |
| Figura 10- Caracterização das linhagens de TIGR4 nocauteadas para pspA por |
| PCR e western blot – Janus Cassette46 |
| Figura 11- Análise da transformação de TIGR4-Δ <i>pspA</i> para a troca alélica por PCR- |
| Janus Cassette-pspA147 |
| Figura 12- Análise da transformação de TIGR4-Δ <i>pspA</i> para a troca alélica por PCR |
| e western blot- Janus Cassette-pspA448 |
| Figura 13- Caracterização das linhagens de TIGR4 nocauteadas para pspA por |
| PCR e western blot – Sweet Janus Cassette49 |
| Figura 14- Análise da transformação de TIGR4-Δ <i>pspA</i> para a troca alélica por PCR |
| - Sweet Janus Cassette- pspA1 e pspA4 (oligonucleotídeos Sw5112/3112)50 |
| Figura 15- Análise da transformação de TIGR4-Δ <i>pspA</i> para a troca alélica por PCR |
| – Sweet Janus Cassette – pspA1 e pspA4(oligonucleotídeos LSM12/SKH2)50 |
| Figura 16- Análise da transformação de TIGR4-Δ <i>pspA</i> para a troca alélica por |
| western blot – Sweet Janus Cassette- pspA1 e pspA451 |
| Figura 17- SDS-PAGE 12% das proteínas recombinantes purificadas |
| Figura 18- Indução de anticorpos IgG anti-rPspA53 |

Figura 19- Ligação de anticorpos IgG anti-PspA à superfície do pneumococo......54 Figura 20- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos colonizados experimentalmente com 491/00 OPT^R (PspA1), 679/99 OPT^R (PspA3) ou 472/96 TMP^R (PspA4)......56 Figura 21- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos Figura 22- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos colonizados experimentalmente com as misturas 491/00 (PspA1) + 679/99 OPT^R Figura 23- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos desafiados com mistura de isolados 491/00 (PspA1) + 472/96 TMP^R (PspA4) rPspA1 a rPspA5.....60 Figura 24- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos desafiados com mistura de isolados 491/00 (PspA1) + 472/96 TMPR (PspA4) rPspA1+rPspA4 e rPspA1/rPspA4.....61 Figura 25- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos colonizados experimentalmente com mistura de isolados dos sorotipos 6B e 23F...62 Figura 26- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos imunizados com rPspAs e desafiados com mistura de isolados dos sorotipos 6B e 23F......63 Figura 27- Indução de anticorpos IgG anti-rPspA 2 e anti-rPspA3......64 Figura 28- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos imunizados com rPspAs e wP na primeira dose, e desafiados com mistura de isolados dos sorotipos 6B e 23F.65 Figura 29- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos desafiados com mistura de isolados 23F OPKA (PspA2) + 6B OPKA SPEC^R (PspA3) – rPspA1 a rPspA5......66 Figura 30- Razão das UFCs de pneumococos recuperados da nasofaringe de

LISTA DE TABELAS

| Tabela 1- Isolados de S. pneumoniae. 36 |
|---|
| Tabela 2- Oligonucleotídeos utilizados para classificação de PspA em famílias e |
| clados |
| Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados para construção das linhagens derivadas da |
| TIGR4 |
| Tabela 4- Oligonucleotídeos utilizados para os ensaios de qPCR (Azzari et al. |
| 2010)45 |
| Tabela 5- Massa molecular e pl preditos para as proteínas PspAs. 52 |
| Tabela 6- Mediana da intensidade de fluorescência do total de bactérias55 |
| Tabela 7– Comparação entre UFC recuperada em placa e estimativa por qPCR68 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Amp Ampicilina
- BSA Bovine Serum Albumin
- CDR Clade Defining Region
- CRM197 Toxina Diftérica Mutada, sem atividade tóxica
- DO Densidade Óptica
- ELISA Enzyme-linked Immunosorbent Assay
- FITC Isotiocianato de fluoresceína
- H₂O₂ Água Oxigenada
- His Histidina
- lg Imunoglobulina
- IgG Imunoglobulina G
- kDa KiloDalton
- LPS Lipopolissacarídeo
- M Molar
- mM Milimolar
- µg Micrograma
- µL Microlitro
- nm Nanômetro
- **OPD** Ortofenilenodiamina
- pb Pares de Bases
- PCR Polymerase Chain Reaction
- PCV7 7-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine
- PCV10 10-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine
- PCV13 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine
- PS Polissacarídeo Capsular
- PspA Pneumococcal Surface Protein A
- pspA Gene da Pneumococcal Surface Protein A
- PspC Pneumococcal Surface Protein C
- SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
- TBS Tris Buffered Saline
- THY Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura
- UFC unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

| 1 INTRODUÇÃO |
|--|
| 1.1 Streptococcus pneumoniae20 |
| 1.2 Epidemiologia20 |
| 1.3 Antibióticos e Vacinas23 |
| 1.4 PspA (Pneumococcal Surface Protein A)29 |
| 2 OBJETIVOS |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS |
| 3.1 Lista de meios de cultura e soluções34 |
| 3.2 Isolados de Streptococcus pneumoniae35 |
| 3.3 Tipagem de PspA |
| 3.4 Construção das linhagens TIGR4 nocaute para <i>pspA</i> (TIGR4-Δ <i>pspA</i>) expressando PspA1 (TIGR4-PspA1) e expressando PspA4 (TIGR4-PspA4)37 |
| 3.5 Reação de polimerização em cadeia para amplificação dos genes <i>pspA1</i> e <i>pspA4</i> |
| 3.7 Western blot |
| 3.8 Expressão e purificação das proteínas PspA recombinantes |
| 3.9 Imunização dos camundongos41 |
| 3.10 Avaliação da indução de anticorpos contra PspA por ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)42 |
| 3.11 Colonização experimental e avaliação de co-colonização da nasofaringe de camundongos utilizando isolados clínicos expressando diferentes PspAs 43 |
| 3.12 Ensaios de ligação de anticorpos IgG anti-PspA à superfície da bactéria por citometria de fluxo |
| 3.13 PCR quantitativo em tempo real45 |
| 4 RESULTADOS |
| 4.1 Construção das linhagens derivadas de TIGR4 expressando diferentes PspAs46 |

| 4.2 Expressão e purificação das proteínas rPspA | 51 |
|---|---------------------|
| 4.4 Análise de ligação de anticorpos IgG anti-PspA à superfície da citometria de fluxo | bactéria por 53 |
| 4.5 Avaliação de co-colonização utilizando isolados clínicos e diferentes PspAs | expressando 55 |
| 4.6 Quantificação de isolados dos sorotipos 6B e 23F por PCR qua tempo real | antitativo em 68 |
| 5 DISCUSSÃO | 69 |
| 6 CONCLUSÃO | 75 |
| REFERÊNCIAS | 76 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Streptococcus pneumoniae

O Streptococcus pneumoniae, bactéria pertencente à família Streptococcaceae e comumente conhecido como pneumococo, é um diplococo Gram-positivo e anaeróbico facultativo. É uma bactéria capsulada com morfologia de cocos (0,5 a 1,25 µm de diâmetro) e arranjada em pares (diplococos) ou em cadeias curtas. São organismos imóveis e não formam esporos (Bergey, Breed, 1957; Broome, Facklam, 1981).

O pneumococo faz parte da microbiota normal da nasofaringe de seres humanos sadios, mantendo um relacionamento comensal com o seu hospedeiro, mas é um patógeno causador de diversas doenças com alta mortalidade e morbidade, como meningite, pneumonia, bacteremia e sepse, além de outras infecções frequentes do trato respiratório, como otite média e sinusite.

O S. pneumoniae possui vários fatores de virulência: cápsula polissacarídica (PS), pneumolisina (Ply), proteína A de superfície de pneumococo (PspA), proteína C de superfície de pneumococo (PspC), e adesina A de superfície de pneumococo (PsaA). O polissacarídeo capsular é o fator de virulência mais importante, pois possui atividade anti-fagocítica e facilita a aderência e a colonização das células epiteliais da nasofaringe (Steel et al., 2013). Esta cápsula possui diferenças na sua composição e estrutura, sendo a base da diferenciação sorológica dos pneumococos em mais de 90 sorotipos.

1.2 Epidemiologia

A incidência de doenças pneumocócicas e a mortalidade são maiores em crianças menores que cinco anos de idade, idosos e em indivíduos imunocomprometidos (Centers for Disease Control and Prevention, 2008). A colonização da nasofaringe é um pré-requisito para desenvolvimento de doenças pneumocócicas e transmissão da bactéria.

A colonização da nasofaringe por pneumococo é comum e a frequência varia de acordo com a localização geográfica e condições socioeconômicas, com taxas prevalentes de 40-90% em crianças menores do que cinco anos de idade, e de 1-10% em adultos (Adetifa et al., 2012; Bogaert et al., 2004). A colonização simultânea por múltiplas cepas de pneumococo também é comum, sendo que aproximadamente metade das crianças são co-colonizadas simultaneamente com duas ou mais cepas de *S. pneumoniae* (Turner et al., 2011; Wyllie et al., 2014).

Estimou-se que em 2000, houve 14,5 milhões de episódios de doenças pneumocócicas graves no mundo, causando 826.000 mortes em crianças de 1 a 59 meses, das quais 91.000 eram crianças HIV positivas e 735.000 eram crianças HIV negativas. Dentre as mortes de crianças HIV negativas, mais de 61% ocorreram em países africanos e asiáticos (Figura 1). Assim, as infecções causadas por pneumococo seriam responsáveis por 11% de todas as mortes nessa faixa etária (O'brien et al., 2009).



Figura 1- Taxa de mortalidade causada por doenças pneumocócicas. Representada em mortes por 100.000 crianças HIV negativas menores de cinco anos de idade (O'Brien et al., 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em 2008, globalmente, houve 476.000 mortes de crianças HIV negativas menores que cinco anos causadas por infecções pneumocócicas. Isso representou 5% de todas as causas de mortalidade em crianças nesse grupo etário (World Health Organization, 2012) e uma redução de mais de 60% nas mortes de crianças HIV negativas quando comparado ao ano 2000. A pneumonia é a doença mais comum causada por pneumococo e é uma das principais causas de morte em crianças abaixo de 5 anos de idade em países de baixa renda (Figura 2) (GAVI Alliance, 2012). Em 2011, 1,3 milhões dos casos de pneumonia levaram à morte de crianças entre zero e quatro anos em todo o mundo, sendo que 81% dessas mortes ocorreram nos primeiros dois anos de vida. Dentre as doenças que podem ser evitadas através de vacinação, *S. pneumoniae* é o maior causador de pneumonia severa (18,3%) e morte (32,7%), superando o vírus influenza (7% de episódios severos e 11% de mortes) e o *Haemophilus influenzae* tipo b (4% de episódios severos e 16% de mortes) (Walker et al., 2013).



Figura 2- Causas de morte no grupo de crianças menores de 5 anos de idade em países de baixa renda (Adaptado de *Pneumococcal factsheet-* GAVI Alliancehttp://www.gavialliance.org/support/nvs/pneumococcal/).

Estudos mostraram que entre 2004 e 2006, a doença pneumocócica foi responsável por 34.217 hospitalizações no Sistema Único de Saúde Brasileiro (SUS), representando 0,1% de todas as internações no setor público no país. Pneumonia causada por pneumococo foi responsável por 64,8% dessas hospitalizações (Novaes et al., 2011). Estimativas feitas com base em dados de 2005 no Brasil mostraram que doenças pneumocócicas causam mais de 40.000 mortes anuais no país, com mais de 300 casos de sepse, 370.000 casos de otite

média e 150.000 casos de pneumonia, com custos associados de mais de US\$ 240 milhões (Constenla, 2008).

Existem 97 sorotipos de PS descritos (Geno et al., 2015). A maioria das doenças causadas por pneumococo em crianças está relacionada a um número restrito desses sorotipos, que variam, principalmente, de acordo com a região geográfica considerada (Dagan et al., 2004). Dados do programa de vigilância *The Tigecycline Evaluation Surveillance Trial* (TEST) mostraram que os sorotipos mais comuns em doença invasiva, entre 2004 e 2008, mundialmente em crianças menores que cinco anos foram os sorotipos 19A (28%), 19F (10%) e 14 (9%), enquanto que os mais comuns em adultos com mais de 16 anos foram os sorotipos 19A (13%), 3, 6A e 7F (7%- soma dos 3 sorotipos) (Hackel et al., 2013). Aproximadamente 23 sorotipos são responsáveis por 80-90% das doenças pneumocócicas invasivas. O sorotipo também está envolvido com a gravidade da doença, e o impacto clínico de uma vacina pneumocócica normalmente depende da cobertura dos sorotipos que estão associados com as doenças invasivas ou com a resistência do pneumococo aos antibióticos (Aliberti et al., 2014).

A morbidade e mortalidade por pneumonia na infância estão diminuindo, certamente devido à campanha mundial de imunização, mas ainda é necessário agir globalmente e em nível nacional para acelerar essa redução.

1.3 Antibióticos e Vacinas

As infecções causadas por pneumococo foram por muitos anos tradicionalmente tratados com penicilina ou ampicilina. Contudo, a resistência, vista pela primeira vez na década de 1960, continuou a aumentar em todo o mundo nas décadas mais recentes. A emergência da resistência à penicilina e a outros antibióticos β -lactâmicos em pneumococos levou ao aumento da utilização de macrolídeos, fluoroquinolonas e outros antibióticos não- β -lactâmicos para infecções pneumocócicas. Vários estudos demonstraram a dificuldade de estabelecer um tratamento efetivo contra a bactéria, devido o surgimento de pneumococos resistentes a diversos antibióticos, como tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol e até mesmo às cefalosporinas de terceira geração (Felmingham et al., 2007; Kim et al.,

2012). Assim, a vacinação continua sendo a estratégia ideal para o controle das doenças pneumocócicas.

As vacinas disponíveis no mercado baseiam-se na indução de anticorpos anti-PS, com alta eficiência contra doença pneumocócica invasiva. No entanto, existem limitações quanto ao seu uso. A primeira geração de vacinas é composta por PS dos 23 sorotipos prevalentes (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19 A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F- Pneumovax- Merck), sendo indicada somente para idosos, visto que é pouco imunogênica em crianças. A resposta imune é independente de células T e, consequentemente, não induz memória imunológica.

As vacinas de segunda geração são compostas de PS conjugados a proteínas carregadoras. A primeira vacina de segunda geração, 7-valente (PCV7), foi licenciada em 2000 e contém os sete sorotipos que eram mais prevalentes na época nos Estados Unidos e Europa (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F- Prevenar-Wyeth) conjugados com uma toxina diftérica mutada, a CRM197. Esta vacina tem indicação de uso em crianças com um custo entre US\$ 50-60 por dose, sendo que a imunização completa é composta de três doses. Tal vacina mostrou-se eficiente na proteção contra infecções invasivas em crianças, apresentando, na época em que foi licenciada, cobertura de 85% nos Estados Unidos e 60-70% na Europa (Pelton et al., 2003), mas de apenas 58% no Brasil (Brandileone et al., 2003). Devido à conjugação com um componente proteico, a vacina 7-valente induz uma resposta dependente de células T e memória, além de diminuir a colonização da nasofaringe por pneumococo. No entanto, como a proteção induzida por essa vacina é sorotipo específica, foi observada a substituição de sorotipos mais prevalentes em doença invasiva em vários estudos realizados após seu licenciamento (Frazão et al., 2005; Huang et al., 2005), efeito causado pela pressão seletiva promovida pela vacina (Weinberger et al., 2011). O sorotipo não-vacinal 19A tornou-se a causa predominante de doença pneumocócica invasiva em crianças nos Estados Unidos após a introdução da PCV7 (Hicks et al., 2007). Outro exemplo da alteração de sorotipos ocorreu com o aumento do sorotipo 6C, que foi descrito em 2007 (Park et al., 2007). Dados sugerem que nos Estados Unidos (Nahm et al., 2009) e no Reino Unido (Tocheva et al., 2010) houve um aumento do sorotipo 6C na colonização após a introdução da PCV7. Aumento em doença pneumocócica invasiva causada pelo sorotipo 6C também foi demonstrado nos Estados Unidos (Richter et al., 2013).

Outras duas novas vacinas de segunda geração foram licenciadas. Uma das formulações é a vacina 10-valente (Synflorix- GlaxoSmithKline Biologicals) que contém 10 sorotipos (PCV10- 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, 1, 5 e 7F) conjugados à proteína D de *Haemophilus influenzae*, toxóide tetânico ou toxóide diftérico (Prymula et al., 2006; Prymula, Schuerman, 2009). A outra contém 13 sorotipos conjugados à CRM197 (Prevenar 13- Pfizer) e foi licenciada em substituição à vacina 7-valente, apresentando seis sorotipos adicionais (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F e 23F) (Bryant et al., 2010; Scott et al., 2007). O processo de purificação e conjugação de até treze sorotipos de PS é complexo, gerando um alto custo de produção dessas vacinas.

Em 2010, a PCV10 foi introduzida no Programa Nacional de Imunização do Ministério da Saúde no Brasil. Sua utilização representa um grande ônus ao sistema público de saúde devido seu alto custo. Mesmo que essa vacina seja eficiente contra infecções invasivas causadas por sorotipos vacinais, ainda há o risco de substituição de doença causada por sorotipos não-vacinais. A partir de dados de colonização da nasofaringe em crianças com menos de cinco anos em Goiânia, foi estimado que a PCV13 apresentaria 72% de cobertura de sorotipos, enquanto que a PCV10 teria apenas 59% de cobertura no Brasil (Franco et al., 2010).

Nos Estados Unidos (EUA), após a substituição da PCV7 pela PCV13 no calendário de imunização no ano de 2010, houve redução de 42% nas doenças pneumocócicas invasivas no primeiro ano de sua implementação, em comparação com a média dos casos que ocorreram entre 2007 a 2009. No grupo de crianças com menos de dois anos de idade, essa diminuição foi ainda maior, chegando a 53%. Além disso, foi observada uma redução de 57% no isolamento dos sorotipos vacinais neste mesmo período, sendo que os sorotipos 19A, 7F e 3 tiveram uma redução de 58%, 54% e 68%, respectivamente. Os sorotipos não contidos na PCV13 mais encontrados em 2010 e 2011 foram: 33F, 22F, 12, 15B, 15C, 23A e 11 (Kaplan et al., 2013). A PCV13 reduziu as doenças pneumocócicas invasivas em todos os grupos etários, quando utilizada rotineiramente em crianças, nos EUA. Foi estimado que mais de 30.000 casos de doenças pneumocócicas invasivas e 3.000 mortes foram evitadas nos primeiros três anos após a introdução do PCV13. Tais resultados mostraram que há uma garantia de que, semelhante a PCV7, PCVs com

sorotipos adicionais também podem prevenir a transmissão para populações não vacinadas (Moore et al., 2015).

No Brasil, um estudo realizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo mostrou que, após a implementação da PCV10, houve uma redução significativa na incidência de doença pneumocócica invasiva no grupo de crianças menores de dois anos de idade, de 20,3 para 3,97 casos/1.000 pessoas (Dos Santos et al., 2013). Além disso, foi observado que também houve uma redução de doenças pneumocócicas invasivas causadas pelos sorotipos vacinais. Andrade e colaboradores mostraram que dentre os sorotipos contidos na vacina PCV10, os mais comumente observados na colonização da nasofaringe eram os sorotipos 6B (11,6%), 23F (7,8%), 14 (6,8%) e 19F (6,6%). Crianças que receberam duas ou três doses de PCV10 durante o primeiro ano de vida apresentaram uma redução significativa na colonização da nasofaringe por sorotipos contidos na vacina quando comparado com crianças não vacinadas (Andrade et al., 2014). Outro estudo mostrou que uma única dose da PCV10 oferece proteção significativa contra doenças invasivas causadas por sorotipos vacinais em crianças de 12 a 23 meses de idade (Domingues et al., 2014).

A maneira mais eficaz de prevenir doenças e mortes causadas pelo pneumococo é garantir que todas as crianças tenham acesso a vacinas seguras. Isto foi reconhecido na recomendação da OMS de 2007 - e, posteriormente, reforçada em 2012 - que vacinas pneumocócicas devem ser introduzidas em todos os programas nacionais de vacinação, especialmente em países com alta mortalidade infantil. A vacina pneumocócica foi introduzida em 117 países até o final de 2014, e a cobertura global foi estimada em 31% (Figura 3) (WHO/ UNIFCEF, 2015). Os países que introduziram a vacina pneumocócica conjugada no programa nacional de imunização, e que planejam introduzi-la em 2016, estão representados na Figura 4 (WHO/IVB, 2016).



Figura 3- Cobertura vacinal no mundo em 2014 (Adaptado de WHO/UNICEF Global Immunization Data, July 2015- http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs378/en/).



Figura 4- Introdução ou o planejamento de introdução para 2016 da vacina pneumocócica conjugada em todo o mundo. (Adaptado de WHO/IVB Database, as of 11 January 2016-Map production Immunization Vaccines and Biologicals (IVB), World Health Organization).

O uso das vacinas polissacarídicas conjugadas a carregadores proteicos reduziu de forma significativa a incidência de doenças invasivas causada pelos sorotipos vacinais. No entanto, existem várias desvantagens, como o alto custo de produção, proteção estritamente sorotipo-específico e a substituição por doença causada por sorotipos não contidos na formulação vacinal. Deste modo, o desenvolvimento de novas vacinas mais eficazes contra *S. pneumoniae* continua sendo prioridade. Uma estratégia importante envolve a utilização de antígenos proteicos, separados ou combinados, comuns a todos os sorotipos de pneumococos. Uma vacina proteica apresentaria baixo custo de produção, eliminaria a dependência do sorotipo e induziria uma resposta de memória T-dependente mais imunogênica em crianças.

Os antígenos de pneumococo mais estudados até o momento e, aparentemente, os candidatos vacinais mais promissores são: pneumolisina (Ply), proteína A de superfície de pneumococo (PspA), proteína C de superfície de pneumococo (PspC), adesina A de superfície de pneumococo (PsaA) e neuraminidase A (NanA) (Figura 5).



Figura 5- Representação esquemática da superfície de pneumococo. (Adaptado Briles et al., 2000)

1.4 PspA (Pneumococcal Surface Protein A)

PspA é uma proteína encontrada em todos os isolados de pneumococo e apresenta variabilidade estrutural e antigênica em diferentes cepas. Atua na interação entre o patógeno e o hospedeiro interferindo na ativação e deposição de fatores do sistema complemento na superfície da bactéria (Ren et al., 2004; Tu et al., 1999). Foi proposto que PspA impediria a ligação de proteína C-reativa à fosfocolina da parede e membrana do pneumococo, evitando a deposição de complemento pela via clássica (Mukerji et al., 2012). Também foi descrito que tal proteína é capaz de se ligar à apolactoferrina presente nas secreções de mucosas, inibindo sua atividade bactericida (Shaper et al., 2004). Estudos demonstraram que PspA recombinante administrada com adjuvantes é capaz de induzir uma resposta de anticorpos protetora em desafios letais em modelos animais (Briles et al., 2000; Briles et al., 2003).

PspA é composta por um domínio na região C-terminal de ligação à colina que ancora a proteína à superfície celular; ao lado desse domínio há uma região rica em prolinas e na região N-terminal há um domínio em α-hélice que fica exposto na parede bacteriana (Yother, Briles, 1992) (Figuras 5 e 6). Baseando-se na diversidade de sequência de aminoácidos da região variável identificada antes da região rica em prolinas, denominada "clade defining region" (CDR), Hollingshead e colaboradores apresentaram uma classificação para os isolados de pneumococo, agrupando-os em 3 famílias: a família 1, subdividida nos clados 1 e 2; a família 2, subdividida nos clados 3, 4 e 5; e a família 3, de ocorrência bastante reduzida com o clado 6 (Hollingshead et al., 2000) (Figura 7). Como a reatividade cruzada entre as famílias é baixa, foi sugerido que uma vacina baseada em PspA deveria conter ao menos um PspA pertencente à família 1 e outro à família 2 para apresentar uma maior cobertura, protegendo contra a grande maioria dos isolados de pneumococo.



Figura 6- Representação esquemática dos domínios contidos nas proteínas PspA. (Adaptado de Moreno et al., 2010)

A partir da análise de fragmentos de PspA de clados 1 a 5, nosso grupo observou que PspA de clado 4 (PspA4) e de clado 5 (PspA5) foram capazes de induzir anticorpos que reconhecem a maioria dos isolados de pneumococo em experimentos de western blot (Darrieux et al., 2008; Moreno et al., 2010). Os anticorpos gerados contra PspA4 e PspA5 foram ainda capazes de mediar deposição de complemento in vitro em bactérias expressando PspAs dos clados 1 a 5, além de induzir proteção de camundongos contra desafio letal com bactérias expressando PspA de família 1 ou família 2 (Moreno et al., 2010). Esses experimentos foram realizados com imunização por via parenteral, utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante. Imunização com PspA5 sob a forma de vacina de DNA por via intramuscular foi capaz ainda de induzir proteção cruzada contra a colonização da nasofaringe de camundongos (Ferreira et al., 2010). Nosso grupo mostrou ainda que a imunização de camundongos com PspA5 por via nasal, utilizando a vacina celular pertussis (wP) como adjuvante, levou à proteção contra desafio intranasal letal com isolado expressando PspA do mesmo clado e contra desafio de colonização com isolado expressando PspA de clado 1 (PspA1) (Oliveira et al., 2010). A imunização com PspAs de diferentes clados não foi analisada neste trabalho publicado.



Figura 7- Classificação de PspA em famílias e clados. Com base nas variações da região CDR, PspA foi dividida em 3 famílias, subdividida em 6 clados, de acordo com o grau de identidade (família 1, com clados 1 e 2, família 2, clados 3, 4 e 5, e família 3, clado 6) (Hollingshead et al., 2000).

A avaliação do genoma completo de 240 isolados de pneumococo provenientes de uma linhagem resistente a múltiplos antibióticos (Croucher et al., 2011) e de 616 isolados obtidos da nasofaringe de humanos saudáveis após a introdução da PCV7 (Croucher et al., 2013) mostrou que além da região que contém os genes de síntese da cápsula, os *loci* que sofreram maior pressão seletiva com alta taxa de recombinação foram *pspA*, *pspC* e *psrP*. Assim, foi proposto que esses antígenos são realmente importantes, pois estão envolvidos na evasão do sistema imune, mas que sua utilização como vacina poderia levar a um fenômeno semelhante àquele observado com a substituição de sorotipos através do uso da vacina conjugada. Acredita-se que a substituição de sorotipos em doença invasiva deva-se a uma diminuição da colonização da nasofaringe de indivíduos saudáveis por sorotipos vacinais e um aumento concomitante da colonização por sorotipos não-vacinais. Esses sorotipos não-vacinais passariam então a ser predominantes entre os isolados que circulam na população e, consequentemente, mais frequentes em doenças pneumocócicas. Desse modo, seria importante avaliar o impacto da

vacinação com as variantes de PspA em modelos que mimetizariam a exposição e colonização da nasofaringe com diferentes isolados de pneumococo.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é testar a eficácia da imunização nasal com PspAs recombinantes de diferentes clados (rPspA1 ao rPspA5) em modelo de cocolonização da nasofaringe de camundongos, utilizando isolados que expressam diferentes PspAs (PspA1 ao PspA4).

Os objetivos específicos são

- Obter isolados derivados da linhagem TIGR4 expressando diferentes PspAs a partir de um mesmo *background* genético, para testar a eficácia de diferentes rPspAs em um modelo de co-colonização da nasofaringe de camundongos;
- Imunizar camundongos por via nasal com rPspA de diferentes clados e avaliar a proteção contra co-colonização com isolados clínicos expressando diferentes PspAs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Lista de meios de cultura e soluções

1 Meios de Cultura:

1.1 Meio líquido LB: triptona 1% (m/V), extrato de levedura 0,5% (m/V) e NaCl 1% (m/V).

1.2 Meio líquido LB-amp: meio LB e 100 µg/mL de ampicilina.

1.3 Meio líquido LB/ON: triptona 1% (m/V) e extrato de levedura 0,5% (m/V).

1.4 Meio líquido LB/ON-amp: meio LB/ON e 100 µg/mL de ampicilina.

1.5 Meio sólido LB/ON-amp: meio LB/ON-amp e 1,6% (m/V) de ágar.

1.6 Meio THY: meio Todd-Hewitt (Difco) contendo 0,5% de extrato de levedura.

 Placa de ágar sangue: meio Tryptic Soy Agar (TSA), 5% de sangue de carneiro (V/V) (Laborclin).

1.8 Meio de estoque de pneumococo: meio THY contendo 20% de glicerol.

1.9 Meios para transformação de pneumococo: 1- meio THY pH 6,8 com 1 mM CaCl₂ e 0,2% BSA; 2- meio THY pH 8,0 com 1 mM CaCl₂ e 0,2% BSA.

2 Soluções para SDS-PAGE:

2.1 Tampão de amostra para SDS-PAGE 5x: 250 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 10% (m/V), azul de bromofenol 0,5% (m/V), glicerol 50% (V/V) e 1M β -mercaptoetanol .

2.2 Tampão Tris-glicina 5x: Tris base 1,5% (m/V), glicina 9,4% (m/V) e SDS 0,5% (m/V).

2.3 Solução corante de SDS-PAGE: *comassie brillant blue* 0,25% (m/V), etanol 40% (V/V) e ácido acético 10% (V/V).

2.4 Solução descorante de SDS-PAGE: etanol 30% (V/V) e ácido acético 10% (V/V).

2.5 Solução secante de SDS-PAGE: etanol 50% (V/V) e ácido acético 10% (V/V).

3 Soluções para western blot:

3.1 Solução TBS-T 0,1%: 100 mM de Tris-HCl pH 8,0, 150 mM de NaCl, 0,1% de Tween 20.

3.2 Tampão de transferência: tampão Tris-glicina, 20% de etanol.

3.4 Solução de bloqueio: TBS-T e 5% de leite em pó desnatado.

3.5 Tampão de lise: 0,1% desoxicolato de sódio, 0,01% SDS, 150 mM citrato de sódio.

4 Soluções para purificação das proteínas recombinantes:

4.1 Tampão de equilíbrio: 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl e 5 mM imidazol.

4.2 Tampão de lavagem: 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl e 20 mM ou 40 mM de imidazol.

4.3 Tampão de eluição: 50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl e 250 mM imidazol.

4.4 Tampão de diálise: 10 mM Tris pH 8,0, 20 mM NaCl, 0,1% glicina.

5 Soluções para ELISA:

5.1 PBS (tampão fosfato): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4.

5.2 PBS-T: PBS e 0,05% Tween 20 (V/V).

5.3 Tampão PBS-T/BSA 1%: PBS-T e 1% albumina bovina sérica.

5.4 Tampão carbonato-bicarbonato: 50 mM Na₂CO₃ e 50 mM NaHCO₃, pH 9,6.

5.5 Tampão citrato-fosfato: 100 mM citrato de sódio e 300 mM fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄) pH 5,0.

5.6 Solução substrato para revelação do ELISA: tampão citrato-fosfato pH 5,0, 0,04% de ortofenildiamina (Sigma) e 0,01% H_2O_2 .

<u>6 Solução anestésica para imunização e desafio</u>: 20 mg/kg de xilazina e 50 mg/kg de quetamina.

7 Solução para eutanásia: 60 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de quetamina.

3.2 Isolados de Streptococcus pneumoniae

Os isolados de pneumococo foram cultivados em placas de ágar-sangue e posteriormente em meio líquido THY. Os estoques das bactérias foram mantidos a - 80 °C em THY contendo 20% de glicerol. Foram utilizadas a linhagem de laboratório TIGR4 e os isolados clínicos de pneumococo St371/00, St491/00, St472/96, St679/99, HU368/06, HU780/05, SPEC 6B OPKA, EMC 23F OPKA (Tabela 1). Os isolados St371/00, St491/00, St472/96 e St679/99 foram cedidos pela Dra Maria Cristina C. Brandileone do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Os isolados HU368/06 e HU780/05 foram cedidos pela Dra Marina B. Martinez do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (São Paulo). Os isolados SPEC 6B OPKA e EMC 23F OPKA foram cedidos pelo Dr Moon Nahm da Universidade do Alabama em Birmingham (EUA).
| Isolados | Sorotipo | PspA | Nomenclatura |
|--------------|----------|------|--------------|
| TIGR4 | 4 | 3 | TIGR4 |
| St491/00 | 6B | 1 | 491/00 |
| St371/00 | 6B | 2 | 371/00 |
| St679/99 | 6B | 3 | 679/99 |
| St472/96 | 6B | 4 | 472/96 |
| HU368/06 | 23F | 2 | HU23F |
| HU780/05 | 6B | 3 | HU6B |
| SPEC 6B OPKA | 6B | 3 | 6B OPKA |
| EMC 23F OPKA | 23F | 2 | 23F OPKA |

Tabela 1- Isolados de S. pneumoniae.

3.3 Tipagem de PspA

Primeiramente, foi realizado o teste de família para identificar os isolados como família 1 ou 2. Para isso a região N-terminal de *pspA* foi amplificada por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) com os pares de oligonucleotídeos LSM12/SKH63 (família 1) e LSM12/SKH52 (família 2) (Tabela 2) (Swiatlo et al., 1997). Para definir o clado, foi realizada reação de PCR com os oligonucleotídeos LSM12 e SKH2 a partir do DNA genômico extraído (*DNeasy Blood & Tissue Kit*- Qiagen) de cada isolado de pneumococo. O fragmento amplificado foi separado em gel de agarose 1% e purificado (*QIAquick Gel Extraction Kit* - Qiagen). O sequenciamento foi realizado com o oligonucleotídeo SKH2 em sequenciador 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies). As sequências foram submetidas no BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*- NCBI) e analisadas por comparação com isolados de clados específicos já sequenciados (Hollingshead et al., 2000).

| Oligonucleotídeo | Sequência |
|------------------|---------------------------------------|
| LSM12 | 5'CCGGATCCAGCGTCGCTATCTTAGGGGCTGGTT3' |
| SKH52 | 5'TGGGGGTGGAGTTTCTTCTTCATCT3' |
| SKH63 | 5'TTTCTGGCTCATCTAACTGCTTTC3' |
| SKH2 | 5'CCACATACCGTTTTCTTGTTTCCAGCC3' |

3.4 Construção das linhagens TIGR4 nocaute para *pspA* (TIGR4-Δ*pspA*) expressando PspA1 (TIGR4-PspA1) e expressando PspA4 (TIGR4-PspA4)

Para a construção das linhagens derivadas de TIGR4, foi utilizado o Janus Cassette (JC) (Sung et al., 2001) que apresenta um gene de resistência (kan¹) à canamicina (Kn) e um gene dominante (rpsL), conferindo sensibilidade à estreptomicina (STR). O JC foi utilizado para nocautear o gene pspA na linhagem TIGR4. Clones naturalmente resistentes à STR foram selecionados em placa ágarsangue com STR (300 µg/ml) e transformados com um plasmídeo contendo o JC inserido entre as regiões flanqueadoras de *pspA* (pGEM-TE *pspA*-Janus-*pspA*). Este plasmídeo já havia sido construído em nosso laboratório (Miyaji et al., 2015). Para a construção deste plasmídeo, a região 1000 pb upstream de pspA (contendo um sítio Xbal na extremidade 3'), a região 1000 pb downstream de pspA (contendo um sítio BamHI na extremidade 5') e o JC (contendo um sítio Xbal na extremidade 5' e um sítio BamHI na extremidade 3') foram amplificados por PCR. Os fragmentos foram digeridos com as enzimas de restrição e ligados. Uma nova reação de PCR foi realizada para a amplificação do fragmento compreendendo a região upstream de pspA, o JC e a região downstream de pspA utilizando os oligonucleotídeos PspA5'flankF e PspA3'flankR (Tabela 3). O fragmento gerado foi clonado em pGEM-T Easy (Promega), gerando pGEM-TE pspA-Janus-pspA. Clones resistentes à Kn (200 µg/ml) e sensíveis à STR foram selecionados e o nocaute de pspA foi confirmado por PCR e western blot, gerando TIGR4- $\Delta pspA$.

A substituição por *pspA* foi realizada através de transformação do clone com *pspA* nocauteado com um fragmento amplificado por PCR contendo o gene *pspA1* ou *pspA4* com suas regiões flanqueadoras (oligonucleotídeos PspA5'flankF e PspA3'flankR- Tabela 3). Foram selecionados clones resistentes à STR e sensíveis à Kn. A alteração por *pspA1* ou *pspA4* também foi avaliada por PCR e *western blot*.

Um estudo recente descreveu um novo cassete, o *Sweet Janus Cassette* (SWJ), para realização de troca alélica em pneumococo contendo, além do marcador de resistência à STR, o gene *sacB* de *Bacillus subtilis*, um marcador adicional contra-selecionável, que confere sensibilidade à sacarose à bactéria (Li et al., 2014). Assim, a segunda recombinação possui dupla seleção de resistência à STR e à sacarose para a excisão do SWJ e inserção do novo alelo do gene. De acordo com esse estudo, o sistema demonstrou que a quantidade de falsos positivos

para o SWJ é 100 vezes menor do que para o JC durante a seleção negativa. O plasmídeo contendo as regiões flanqueadoras de pspA mais o SWJ foi construído para obtenção das linhagens TIGR4- $\Delta pspA$ e TIGR4 expressando PspA1 ou PspA4. O SWJ foi gentilmente cedido pelo Dr Yuan Li da Harvard School of Public Health (EUA). O SWJ foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos Sweet 5112 e 3112 (Tabela 3). O fragmento amplificado foi digerido com Xbal e BamH e inserido no plasmídeo pGEM-TE pspA-Janus-pspA digerido com as mesmas enzimas. O plasmídeo gerado possui a substituição do JC pelo SWJ, sendo denominado agora pGEM-TE pspA-SweetJanus-pspA.

A análise por PCR dos clones obtidos foi feita com os pares de oligonucleotídeos 5112/3112, Sw 5112/3112, TIGR4 PspA up F/TIGR4 PspA down R e LSM12/SKH2 (Tabelas 2 e 3).

| Oligonicleotídeo | Sequência |
|--------------------------|--|
| PspA5'flankF | 5'CGTTAAACCGTTCGGC3' |
| PspA3'flankR | 5'AGCAAATCCCTGTCGA3' |
| 5112 | 5'CTAGTCTAGAGTTTGATTTTTAATGG3' |
| Sweet 5112 | 5'CTAGTCTAGAATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAAG3' |
| 3112 | 5'CGCGGATCCGGGCCCCTTTCCTTATGCTTTTGG3' |
| TIGR4 PspA <i>up</i> F | 5'CGTTAAACCGTTCGGTA3' |
| TIGR4 PspA <i>down</i> R | 5'AGCAAATCCCTGTCGAG3' |

Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados para construção das linhagens derivadas da TIGR4.

3.5 Reação de polimerização em cadeia para amplificação dos genes pspA1 e pspA4

A amplificação do gene pspA e de suas regiões flanqueadoras ocorreu a partir dos isolados St435/96 (pspA1) e St255/00 (pspA4) (Darrieux et al., 2008). Foi utilizada a enzima Taq High Fidelity (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante, nas seguintes condições de temperatura e tempo: 94 °C - 4 minutos / 94 $^{\circ}C - 1$ minuto / 50 $^{\circ}C - 1$ minuto / 68 $^{\circ}C - 3$ minutos / 68 $^{\circ}C - 7$ minutos / 4 $^{\circ}C$, realizando 30 ciclos de amplificação. Os oligonucleotídeos utilizados foram: PspA5' flankF (1.000 pb) e PspA3'flankR (1.000 pb) (Tabela 3). Após a reação de PCR, os

fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen).

3.6 Transformação de S. pneumoniae

As bactérias foram cultivadas em THY pH 6,8 (com CaCl₂ e BSA). Após atingir a densidade óptica (DO_{600 nm}) igual a 0,1- 0,15, a cultura foi diluída 1:10 em meio THY pH 8,0 (com CaCl₂ e BSA) (volume final de 12 mL). Foi adicionado 1 mg/mL do peptídeo indutor CSP2 (EMRISRIILDFLFRKK), seguindo-se incubação por 15 min a 37 °C. Uma alíquota de 20 µL do DNA foi adicionada ao cultivo e as amostras foram incubadas por 1 hora a 30 °C. A transformação foi plaqueada em ágar-sangue contendo os antibióticos adequados.

3.7 Western blot

A expressão de PspA foi avaliada no precipitado celular dos isolados, que foram lisados em tampão de lise. O extrato proteico foi separado em gel de poliacrilamida 12% e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 12%) e transferido para membrana de nitrocelulose com tampão de transferência pelo sistema semi-seco (Trans-Blot® SD *semi-dry transfer cell-* Bio-Rad) a 10V por 45 minutos. O bloqueio da membrana foi feito com solução de bloqueio. A membrana foi lavada três vezes com TBS-T e incubada com soro anti-PspA e em seguida, após mais três lavagens, com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase. A detecção foi realizada com o kit de quimioluminescência ECL (GE Healthcare).

3.8 Expressão e purificação das proteínas PspA recombinantes

Escherichia coli BL21 (Si) competentes foram transformadas com os vetores pAE-pspA1, pAE-pspA2, pAE-pspA3, pAE-pspA4 e pAE-pspA5 (Darrieux et al 2008), e crescidas a 30 °C durante 16 horas. Quatro colônias resistentes à ampicilina foram inoculadas em 5 mL de meio LB/ON-amp e crescidas a 30 °C durante 16 horas. Esses inóculos foram diluídos na proporção de 1:20 nesse mesmo meio em um volume final de 10 mL. O crescimento dessas culturas foi acompanhado

até a densidade óptica (DO_{600 nm}) atingir aproximadamente 0,7, quando foi retirada uma alíquota de 1 mL de cada amostra (alíquota não induzida) e nos 9 mL restantes foi adicionado NaCl em uma concentração final de 300 mM para induzir a expressão. Após 3 horas de indução, retirou-se novamente uma alíquota de 1 mL (alíquota induzida). Todas as alíquotas foram centrifugadas e as células foram ressuspendidas com tampão SDS-PAGE 1X. As alíquotas foram aquecidas a 96 °C por 10 minutos e separadas em SDS-PAGE 12% para analisar a expressão das proteínas antes e após a indução.

Para uma expressão em maior escala, os clones com os maiores níveis de expressão foram crescidos em um volume de 300 mL em meio LB/ON-amp e induzidos no mesmo protocolo de indução com NaCl (300 mM) por 3 horas. As células foram centrifugadas a 1.575 g durante 15 minutos, ressuspendidas em 20 mL de tampão de equilíbrio e lisadas no homogeneizador de alta pressão Panda (GEA Niro Soavi- 1.300 bar). As células lisadas foram centrifugadas a 1.575 g por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana de 22 µm. A purificação a partir da fração solúvel foi realizada no sistema Akta Prime Plus utilizando colunas His-Trap (GE Healthcare). Essas proteínas compreendem a região N-terminal madura até a região rica em prolinas, mas não contêm a região Cterminal de ligação à colina. A Figura 8 mostra todas as regiões que compõem os PspAs recombinantes. Após a lise celular, o sobrenadante foi adsorvido à coluna equilibrada com tampão de equilíbrio (5 mM de imidazol). Lavagens foram realizadas com do tampão de lavagem (20 mM e 40 mM de imidazol) e as proteínas foram recuperadas com o tampão de eluição (250 mM de imidazol). Após a cromatografia, as frações coletadas foram separadas e analisadas em SDS-PAGE 12% e em seguida dialisadas em tampão de diálise. Essa solução foi deixada sob agitação constante por 16 horas a 4 °C. A dosagem das proteínas recombinantes foi determinada pelo método de Bradford (Protein Assay kit- Bio-Rad) utilizando BSA como padrão. As proteínas foram estocadas a -20 °C.



Figura 8- Esquema dos domínios estruturais dos fragmentos *pspA*. O domínio em α-hélice (A e B) e a região rica em prolina (C) estão indicados. A região B forma o CDR (região definidora de clado). P indica os blocos de prolina e N indica o bloco NonPro.

3.9 Imunização dos camundongos

O protocolo de experimentação animal foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEAUIB, protocolo n° 1158/13). Camundongos C57BL/6 SPF fêmeas de 5 a 7 semanas, adquiridos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), foram utilizados nos ensaios de imunização via nasal e para os desafios de colonização da nasofaringe.

Para a imunização, as proteínas recombinantes rPspA1 a rPspA5 foram tratadas com Triton X-114 para remoção do excesso do lipopolissacarídeo (LPS) contaminante (Aida, Pabst, 1990). Foram adicionados 10 µL de Triton X-114 em 1 mL das preparações das proteínas e, em seguida, as soluções foram vortexadas e incubadas em gelo por 5 minutos. As amostras foram novamente vortexadas e incubadas a 37 °C por 5 minutos. Após centrifugação a 37 °C por 30 segundos a 15.000 g, a fase aquosa foi coletada e o protocolo foi repetido por mais 4 vezes. As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford e estocadas a 4 °C. Como adjuvante foi utilizada a vacina celular pertussis produzida no Instituto Butantan (wP). O uso da wP como adjuvante de PspA já foi descrito em nosso laboratório (Lima et al., 2013; Oliveira et al., 2010).

Grupos de 5 ou 6 camundongos foram imunizados via nasal com duas doses em um intervalo de 14 dias (Figura 8). Os grupos receberam: salina, wP, rPspA1+wP, rPspA2+wP, rPspA3+wP, rPspA4+wP, rPspA5+wP, rPspA1+rPspA4+wP ou rPspA1+wP (1^a dose) e rPspA4+wP (2^a dose). Para avaliar o efeito do adjuvante wP, grupos de camundongos também foram imunizados com as mesmas formulações citadas, porém sem a adição do adjuvante wP na segunda dose. Cada dose foi composta por 5 µg de proteína recombinante despirogenizada. O volume do adjuvante wP foi determinado a partir da dose da vacina pertussis aplicada em camundongos nos testes de eficácia nos lotes produzidos pelo Instituto Butantan, que equivale a 1/8 da dose aplicada em humanos.

Para cada imunização, os camundongos foram anestesiados com 200 µl de solução anestésica pela via intraperitoneal e foram inoculados 12 µl de cada formulação vacinal via nasal, com auxílio de uma micropipeta. Os animais foram sangrados por punção retroorbital 14 dias após a última imunização. O sangue foi incubado por 30 minutos a 37 °C e em seguida por 16 horas a 4 °C. O material foi então centrifugado a 124 g por 10 minutos a 4 °C. O soro foi coletado e armazenado a -20 °C.



Figura 9- Esquema de imunização e desafio via nasal de camundongos.

3.10 Avaliação da indução de anticorpos contra PspA por ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp®) foram incubadas com solução de proteínas recombinantes (1 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato e mantidas a 4 °C por 16 horas. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e

bloqueadas com tampão PBS-T/BSA a 37 °C por 1 hora. As placas foram lavadas novamente. Diluições seriadas do soro dos camundongos imunizados foram adicionadas em cada poço das placas em tampão PBS-T/BSA, seguindo-se uma incubação a 37 °C por 1 hora e mais três lavagens com PBS-T. A seguir, anticorpo anti-IgG de camundongo produzido em cabra (1/5000 - Southern Biotech) diluído em PBS-T/BSA foi adicionado nas placas seguindo-se uma incubação a 37 °C durante 1 hora. Depois, as placas foram incubadas com anticorpo anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase (HRP) (1/5000 - Southern Biotech) a 37 °C por 1 hora. Após essa incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Os anticorpos foram detectados através da adição do substrato OPD. As reações foram interrompidas com 1,25 M de H₂SO₄ e a absorbância a 492 nm (A_{492 nm}) foi determinada no leitor de ELISA (Labsystems). O título foi determinado como a maior diluição com absorbância \geq 0,1. A análise estatística das diferenças dos títulos de anticorpos entre os grupos foi realizada pelo teste *One-way* ANOVA, seguido do teste de multicomparações de Tukey, utilizando o programa *GraphPad Prism5*.

3.11 Colonização experimental e avaliação de co-colonização da nasofaringe de camundongos utilizando isolados clínicos expressando diferentes PspAs

Para a avaliação de isolados clínicos em modelo de co-colonização da nasofaringe de camundongos foi necessário o isolamento de clones resistentes a antibióticos. Foi avaliada a resistência a optoquina (OPT), estreptomicina (STR) e trimetoprim (TMP) para isolados do sorotipo 6B expressando PspA1 (491/00), PspA2 (371/00), PspA3 (679/99) e PspA4 (472/96). Foram selecionados clones de 491/00 resistentes à OPT, de 371/00 resistentes à STR, de 679/99 resistentes à OPT. O isolado 472/96 mostrou-se naturalmente resistente ao TMP. Também foram avaliados isolados do sorotipo 6B, HU6B e 6B OPKA (resistente à spectinomicina-SPEC), e do sorotipo 23F, HU23F e 23F OPKA (resistente ao TMP).

Os camundongos foram colonizados experimentalmente com 10⁶ UFCs em 10 µL nas duas narinas dos animais, previamente anestesiados pela via intraperitoneal com 200 µL de solução anestésica, com os isolados: 491/00 OPT^R (PspA1), 371/00 STR^R (PspA2), 679/99 OPT^R (PspA3), 472/96 TMP^R (PspA4), 6B OPKA (PspA3), HU23F (PspA2) ou 23F OPKA (PspA2). Considerando a importância de avaliar a co-

colonização com isolados expressando PspA de família 1 (PspA1, PspA2) e de família 2 (PspA3, PspA4 e PspA5), as misturas de bactérias escolhidas para o desafio dos camundongos foram: $5x10^5$ UFCs de 491/00 (PspA1) + $5x10^5$ UFCs de 679/99 OPT^R (PspA3), $5x10^5$ UFCs de 491/00 (PspA1) + $5x10^5$ UFCs de 472/96 TMP^R (PspA4), $5x10^5$ UFCs de HU23F (PspA2) + $5x10^5$ UFCs de 472/96 TMP^R (PspA4), $5x10^5$ UFCs de 23F OPKA (PspA2) + $5x10^5$ UFCs de 472/96 TMP^R (PspA4), $5x10^5$ UFCs de 6B OPKA (PspA3) + $5x10^5$ UFCs de HU23F (PspA2) ou $5x10^5$ UFCs de 6B OPKA (PspA3) + $5x10^5$ UFCs de HU23F (PspA2) ou $5x10^5$ UFCs de 6B OPKA (PspA3) + $5x10^5$ UFCs de 23F OPKA (PspA2) em 10 µL por via nasal. A recuperação de bactérias foi feita 5 ou 7 dias após a colonização experimental. Os animais foram sacrificados com solução de eutanásia, suas traqueias seccionadas e foram feitas duas lavagens com 200 µL de salina cada através da nasofaringe, sendo essas lavagens coletadas pelas narinas dos animais e plaqueadas em placas ágar-sangue com ou sem antibiótico em diluições seriadas para quantificação das UFCs.

A análise estatística da diferença na colonização da nasofaringe dos camundongos foi avaliada pelo teste *t* de *Student* ou *One-way* ANOVA, seguido do teste de multicomparações de Tukey, utilizando o programa *GraphPad Prism5*.

3.12 Ensaios de ligação de anticorpos IgG anti-PspA à superfície da bactéria por citometria de fluxo

Os isolados de *S. pneumoniae* foram descongelados, semeados em placas de ágar-sangue e incubados a 37 °C durante 16 horas. Essas bactérias foram inoculadas em meio THY e cultivadas até DO_{600 nm} igual a 0,4-0,5 (~10⁸ UFC/mL). Esses cultivos foram centrifugados a 3.637 g durante 5 minutos e lavados duas vezes com tampão PBS. As bactérias foram incubadas com 1 ou 5% de soro durante 30 minutos a 37 °C e novamente lavadas mais duas vezes com PBS. Seguiu-se a incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a FITC (1/1000 - Sigma-Aldrich) por mais 30 minutos no escuro e no gelo. Após duas novas lavagens, as amostras foram fixadas com o reagente BD Cytofix[™] e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo com auxílio do aparelho FACSCantoII (BD Biosciences). Foram contados 10.000 eventos e a mediana da intensidade da fluorescência do total de bactérias foi utilizada para comparação entre os grupos.

3.13 PCR quantitativo em tempo real

As amostras de lavado nasal dos experimentos com a mistura 6B OPKA e 23F OPKA foram utilizadas para avaliar a possibilidade de quantificar cada sorotipo através de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Para a purificação do DNA total das amostras de lavado nasal utilizou-se o DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen). De acordo com o protocolo do fabricante, para extração do DNA total de bactérias Gram-positivas foi necessário realizar um pré-tratamento com tampão de lise enzimática contendo lisozima. Após a purificação, as amostras foram quantificadas em ng/µL no equipamento NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Para as curvaspadrão, foram utilizados os DNAs purificados dos sorotipos 23F e 6B nas seguintes concentrações finais: 100 pg/µL, 10 pg/µL, 1 pg/µL, 100 fg/µL, 50 fg/µL ou 5 fg/µL (Sakai et al., 2015). Oligonucleotídeos sorotipo-específicos foram utilizados (Tabela 4). A reação de amplificação por qPCR foi composta por 1X SYBER GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 ng de DNA genômico da amostra de lavado nasal e 400 nM de cada oligonucleotídeo, em um volume final de 25 µL. A reação de cada amostra foi feita em triplicata nas seguintes condições: um ciclo de 95 °C por 2 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos. Os dados de amplificação foram analisados pelo software SDS (7300 Real-time PCR System Sequence Detection Software v1.31- Applied Biosystems).

| Oligonucleotideos | Sequencias |
|-------------------|---------------------------------|
| 6A/B | 5'AAGTTTGCACTAGAGTATGGGAAGGT3' |
| | 3'ACATTATGTCCRTGTCTTCGATACAAG5' |
| 23F | 5'TGCTATTTGCGATCCTGTTCAT3' |
| | 3'AGAGCCTCCGTTGTTTCGTAAA5' |

Tabela 4- Oligonucleotídeos utilizados para os ensaios de qPCR (Azzari et al., 2010).OligonucleotídeosSequências

4 RESULTADOS

4.1 Construção das linhagens derivadas de TIGR4 expressando diferentes PspAs

Para a construção das linhagens derivadas de TIGR4 expressando PspA1 e PspA4 utilizando o *Janus Cassette* (JC), um clone naturalmente resistente à STR foi selecionado e transformado com o plasmídeo pGEM-TE *pspA*-Janus-*pspA*, que contém o JC clonado entre as regiões flanqueadoras de *pspA*. Clones resistentes à Kn e sensíveis à STR foram selecionados e o nocaute do gene *pspA* foi confirmado por PCR e *western blot*, originando TIGR4-∆*pspA*, (Figura 10). A partir do PCR dos clones selecionados, foi possível observar a amplificação de um fragmento de 1.400 pb quando foram utilizados os oligonucleotídeos 5112 e 3112, que amplificam o JC (Figura 10A), confirmando a inserção do cassete. O *western blot* com soro anti-PspA4 mostrou uma forte banda na linhagem TIGR4 e as bandas de menor intensidade são provavelmente resultantes de reatividade cruzada com o antígeno PspC, nas linhagens nas quais o JC foi inserido (Figura 10B). Essa reatividade cruzada já foi descrita pelo nosso grupo (Moreno et al., 2012), e ocorre provavelmente devido à presença de domínios com alta similaridade nestes dois antígenos.



Figura 10- Caracterização das linhagens de TIGR4 nocauteadas para *pspA* por PCR e *western blot – Janus Cassette*. O nocaute do gene *pspA* na linhagem TIGR4 através da inserção do JC foi avaliada por PCR utilizando os oligonucleotídeos 5112 e 3112 (A). A expressão

de PspA foi avaliada por *western blot* utilizando soro anti-PspA4 (B). 1-TIGR4 STR^R, 2-TIGR4-Δ*pspA* clone 1, 3-TIGR4-Δ*pspA* clone 16, 4-TIGR4-Δ*pspA* clone 21.

Para a troca alélica de TIGR4-Δ*pspA*, foi realizado PCR para amplificação de pspA1 e pspA4 com as regiões flanqueadoras a partir do DNA genômico dos isolados St435/96 e St255/00, respectivamente. Clones resistentes à STR e sensíveis à Kn foram selecionados. Foi observado a partir de PCR utilizando os oligonucleotídeos 5112 e 3112 (1.400 pb) que o clone selecionado de TIGR4-pspA1 não apresentou excisão do JC (Figura 11). Para a avaliação da inserção de pspA4 (Figura 12A), foi realizado PCR com os oligonucleotídeos 5112 e 3112 e com TIGR4 PspA up F e TIGR4 PspA down R. Foi observada amplificação de banda correspondente ao JC após amplificação com 5112 e 3112 nos clones 1, 2 e 3 de TIGR4-pspA4, indicando que não houve troca alélica. O PCR com TIGR4 PspA up F e TIGR4 PspA down R confirmou esses dados, com amplificação de banda semelhante à obtida na linhagem TIGR4-∆pspA nos clones 1, 2 e 3 de TIGR4pspA4. Já no clone 5 de TIGR4-pspA4, não houve amplificação do JC após PCR com 5112 e 3112. No entanto, a banda amplificada com os oligonucleotídeos TIGR4 PspA up F e TIGR4 PspA down R possui tamanho abaixo do esperado para amplificação de pspA4 e suas regiões flanqueadoras. O western blot com soro anti-PspA4 apresentou as mesmas bandas na linhagem TIGR4- $\Delta pspA$ mostradas na Figura 10B, confirmando a ausência da expressão da proteína PspA4 (Figura 12B).



Figura 11- Análise da transformação de TIGR4-ΔpspA para a troca alélica por PCR– Janus Cassette-pspA1. A inserção do gene pspA1 na linhagem TIGR4 através da troca alélica com JC foi avaliada por PCR utilizando os oligonucleotídeos 5112 e 3112. 1- TIGR4 STR^R, 2-TIGR4-ΔpspA clone 16, 3- TIGR4-pspA1.



Figura 12- Análise da transformação de TIGR4-Δ*pspA* para a troca alélica por PCR e western blot- Janus Cassette-pspA4. A inserção do gene *pspA4* na linhagem TIGR4 através da troca alélica com JC foi avaliada por PCR utilizando os oligonucleotídeos 5112 e 3112 (#) e TIGR4 PspA up F e TIGR4 PspA down R (*) (A). 1- TIGR4 STR^R #, 2- TIGR4 STR^R *, 3- TIGR4-Δ*pspA* clone 16 #, 4-TIGR4-Δ*pspA* clone 16 *, 5- TIGR4-*pspA4* clone 1 #, 6- TIGR4- *pspA4* clone 1 *, 7- TIGR4- *pspA4* clone 2 #, 8- TIGR4- *pspA4* clone 2 * , 9- TIGR4- *pspA4* clone 3 #, 10- TIGR4- *pspA4* clone 3 *, 11- TIGR4- *pspA4* clone 5 #, 12- TIGR4- *pspA4* clone 5 *. A expressão de PspA foi avaliada por western blot utilizando soro anti-PspA4 (B). 1- TIGR4- STR^R, 2- TIGR4-Δ*pspA* clone 16, 3- TIGR4-*pspA4* clone 1, 4- TIGR4- *pspA4* clone 2, 5- TIGR4- *pspA4* clone 3, 5- TIGR4- *pspA4* clone 5.

Uma nova tentativa de realização de troca alélica na linhagem TIGR4 foi feita utilizando o Sweet Janus Cassette (SWJ). Além do marcador de resistência à STR, este cassete apresenta um marcador adicional contra-selecionável, que confere sensibilidade à sacarose à bactéria. Para a construção das linhagens derivadas de TIGR4 expressando PspA1 e PspA4 utilizando o SWJ, um clone naturalmente resistente à STR foi transformado com o plasmídeo pGEM-TE pspA-SweetJanuspspA, que contém o SWJ clonado entre as regiões flanqueadoras de pspA. Clones resistentes à Kn e sensíveis à STR e à sacarose foram selecionados. O nocaute do gene pspA também foi confirmado por PCR e western blot, originando TIGR4-ApspA (Figura 13). A partir do PCR dos clones selecionados, foi possível observar a amplificação de um fragmento de 2.822 pb quando foram utilizados os oligonucleotídeos Sw5112 e 3112, que amplificam o SWJ (Figura 13A), confirmando a inserção do cassete. O western blot com soro anti-PspA4 mostrou uma forte banda na linhagem TIGR4 e bandas de menor intensidade nas linhagens nas quais o SWJ foi inserido (Figura 13B). Assim como observado para o nocaute realizado com o JC, as bandas de menor intensidade são provavelmente resultantes de reatividade cruzada com o antígeno PspC.



Figura 13- Caracterização das linhagens de TIGR4 nocauteadas para *pspA* por PCR e western blot – Sweet Janus Cassette. O nocaute do gene *pspA* na linhagem TIGR4 através da inserção do SWJ foi avaliada por PCR utilizando os oligonucleotídeos Sw5112 e 3112 (A). A expressão de PspA foi avaliada por western blot utilizando-se soro anti-PspA4 (B). 1-TIGR4 STR^R, 2-TIGR4-Δ*pspA* clone 4, 3-TIGR4-Δ*pspA* clone 5.

Em seguida, foi realizada a transformação de TIGR4- $\Delta pspA$ para a troca alélica com fragmento contendo o gene *pspA1* ou *pspA4* com as regiões flanqueadoras. Foram selecionados clones resistentes à STR e à sacarose e sensíveis à Kn. A partir de PCR, utilizando os oligonucleotídeos Sw5112 e 3112 (2.822 pb), foi verificado que diferentes clones selecionados apresentaram excisão do SWJ após transformação com *pspA1* (Figura 14A) ou *pspA4* (Figura 14B). No entanto, não foi possível confirmar a inserção dos genes *pspA1* ou *pspA4* a partir do PCR utilizando os oligonucleotídeos LSM12 e SKH2 , que amplificam o fragmento entre 1.200 pb e 1.800 pb correspondente ao gene *pspA* (Figura 15).O *western blot* com soro anti-PspA4 apresentou as mesmas bandas na linhagem TIGR4- Δ pspA mostradas nos ensaios anteriores, constatando a falta da expressão das proteínas PspA1 ou PspA4 e a seleção de linhagens falso-positivas (Figura 16).



Figura 14- Análise da transformação de TIGR4-ΔpspA para a troca alélica por PCR – Sweet Janus Cassette- pspA1 e pspA4 (oligonucleotídeos Sw5112/3112). A inserção do gene pspA1 na linhagem TIGR4-ΔpspA através da troca alélica com SWJ foi avaliada por PCR utilizando os oligonucleotídeos Sw5112 e 3112 (A). 1- TIGR4 STR^R, 2- TIGR4-ΔpspA clone 5, 3- TIGR4-pspA1 clone 1, 4- TIGR4-pspA1 clone 2, 5- TIGR4-pspA1 clone 3, 6-TIGR4-pspA1 clone 4, 7- TIGR4-pspA1 clone 5, 8- TIGR4-pspA1 clone 6, 9- TIGR4-pspA1 clone 7, 10- TIGR4-pspA1 clone 8, 11- TIGR4-pspA1 clone 9. A inserção do gene pspA4 na linhagem TIGR4 através da troca alélica com SWJ foi avaliada por PCR utilizando os oligonucleotídeos Sw5112 e 3112 (B). 1-TIGR4 STR^R, 2- TIGR4-ΔpspA clone 5, 3- TIGR4pspA clone 1, 4- TIGR4-pspA4 clone 2, 5- TIGR4-pspA4 clone 3, 6- TIGR4-pspA4 clone 4, 7- TIGR4-pspA4 clone 5, 8- TIGR4-pspA4 clone 6, 9- TIGR4-pspA4 clone 7, 10- TIGR4pspA4 clone 5, 8- TIGR4-pspA4 clone 6, 9- TIGR4-pspA4 clone 7, 10- TIGR4pspA4 clone 8, 11- TIGR4-pspA4 clone 9.



Figura 15- Análise da transformação de TIGR4-ΔpspA para a troca alélica por PCR – Sweet Janus Cassette – pspA1 e pspA4 (oligonucleotídeos LSM12/SKH2). A inserção do gene pspA1 ou pspA4 na linhagem TIGR4-ΔpspA através da troca alélica com SWJ foi avaliada por PCR utilizando os oligonucleotídeos LSM12 e SKH2. 1- TIGR4 STR^R, 2-TIGR4-ΔpspA clone 5, 3- TIGR4-pspA1 clone 3, 4- TIGR4- pspA1 clone 8, 5- TIGR4pspA4 clone 1, 6- TIGR4- pspA4 clone 2, 7- TIGR4-pspA4 clone 4, 8- TIGR4-pspA4 clone 5, 9- TIGR4-pspA4 clone 7, 10- TIGR4-pspA4 clone 8, 11- TIGR4-pspA4 clone 9.



Figura 16- Análise da transformação de TIGR4-ΔpspA para a troca alélica por western blot – Sweet Janus Cassette- pspA1 e pspA4. A expressão de PspA foi avaliada por western blot utilizando soro anti-PspA4. 1- TIGR4 STR^R, 2- TIGR4-ΔpspA clone 5, 3- TIGR4pspA1 clone 3, 4- TIGR4- pspA1 clone 8, 5- TIGR4- pspA4 clone 1, 6- TIGR4- pspA4 clone 2, 7- TIGR4-pspA4 clone 4, 8- TIGR4-pspA4 clone 5, 9- TIGR4-pspA4 clone 7, 10-TIGR4-pspA4 clone 8, 11- TIGR4-pspA4 clone 9.

4.2 Expressão e purificação das proteínas rPspA

Células de *E. coli* transformadas com os vetores pAE-6xHis contendo *pspA* foram cultivadas e induzidas para expressão das proteínas recombinantes. A análise dos cultivos por SDS-PAGE 12% revelou que todas as proteínas recombinantes foram expressas.

Após a análise da expressão inicial das proteínas rPspA, os cultivos foram preparados em maior volume para a purificação das proteínas recombinantes a partir da fração solúvel dos lisados bacterianos. O sobrenadante dos lisados foi submetido à cromatografia utilizando colunas His- Trap e frações de todas as etapas da purificação foram coletadas. Após a purificação, todas as frações de lavagens e as eluições foram analisadas por SDS-PAGE 12% para a visualização da fração na qual a proteína se encontrava. Em seguida, essas frações que continham as proteínas recombinantes foram dialisadas. A Figura 17 mostra as proteínas rPspAs purificadas e dialisadas. As bandas observadas no gel apresentam massa molecular acima do predito (Tabela 5). De fato, a migração anômala de PspA está descrita na literatura (Yother, Briles, 1992).

| Proteína | Massa Molecular (kDa) | pl | |
|----------|-----------------------|------|--|
| rPspA1 | 38,1 | 4,95 | |
| rPspA2 | 39,4 | 5,90 | |
| rPspA3 | 40,0 | 5,01 | |
| rPspA4 | 49,4 | 4,96 | |
| rPspA5 | 45,9 | 4,84 | |

Tabela 5- Massa molecular e pl preditos para as proteínas PspAs.



Figura 17- SDS-PAGE 12% das proteínas recombinantes purificadas. 1 μg das proteínas recombinantes rPspA1 (1), rPspA2 (2), rPspA3 (3), rPspA4 (4) e rPspA5 (5) foram analisados em SDS-PAGE.

4.3 Análise por ELISA da indução de anticorpos anti-rPspA

Camundongos C57BL/6 foram imunizados com duas doses de rPspA1, rPspA2, rPspA3, rPspA4 ou rPspA5 (5 µg) mais a vacina celular pertussis (wP) como adjuvante nas duas doses por via nasal com intervalo de duas semanas. Duas semanas após a última imunização, os animais foram sangrados. A Figura 18 mostra a quantificação de anticorpos IgG anti-rPspA1, anti-rPspA2, anti-rPspA3 e anti-rPspA4, detectados por ELISA nos animais imunizados com rPspAs mais wP nas duas doses. Camundongos imunizados com rPspA1 apresentaram aumento estatisticamente significativo no título de anticorpos IgG anti-rPspA4, enquanto que animais imunizados com rPspA4 apresentaram aumento

estatisticamente significativo no título de anticorpos IgG anti-rPspA3 e anti-rPspA4. Já animais imunizados com rPspA2 e rPspA3 apresentaram aumento de anticorpos apenas contra rPspA do mesmo clado.



Figura 18- Indução de anticorpos IgG anti-rPspA. Camundongos C57BL/6 foram imunizados por via nasal com diferentes rPspAs utilizando wP como adjuvante nas duas doses e anticorpos IgG anti-rPspA1 (A), anti-rPspA2 (B), anti-rPspA3 (C) e anti-rPspA4 (D) foram detectados por ELISA. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina (One-way ANOVA, Tukey's Multicomparison Test- *** P≤0,001).

4.4 Análise de ligação de anticorpos IgG anti-PspA à superfície da bactéria por citometria de fluxo

A capacidade de ligação dos anticorpos à superfície de pneumococos intactos foi avaliada por citometria de fluxo. Na Figura 19, observa-se que somente anticorpos do grupo imunizado com rPspA1 se ligam de forma eficaz à bactéria 491/00 que expressa PspA1 (Figura 19A) e à bactéria 23F OPKA que expressa PspA2 (Figura 19B). Anticorpos do grupo imunizado com rPspA3 e rPspA4 ligam-se eficientemente à bactéria 6B OPKA que expressa PspA3 (Figura 19C), enquanto que somente anticorpos do grupo imunizado com rPspA4 se ligam eficientemente à bactéria 472/96 que expressa PspA4 (Figura 19C). A Tabela 6 mostra a mediana da

intensidade de fluorescência dos grupos analisados. Estes dados estão de acordo com os dados de ELISA, mostrando reatividade de soro anti-rPspA1 com PspAs de família 1 (PspA1 e PspA2) e de soro anti-rPspA4 com PspAs de família 2 (PspA3 e PspA4).



Figura 19- Ligação de anticorpos IgG anti-PspA à superfície do pneumococo. IgG anti-rPspA1 a anti-rPspA5 foram testados quanto à capacidade de ligar-se na superfície intacta das linhagens 491/00 (PspA1) (A), 23F OPKA (PspA2) (B), 6B OPKA (PspA3) (C) e 472/96 (PspA4) por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como histograma de intensidade de fluorescência. ■ - salina, ■ - wP, ■ - rPspA1, ■ - rPspA2, ■ - rPspA3, ■ - rPspA4, ■ - rPspA5.

| Mediana: FITC-A | | | | |
|-----------------|---------|----------|---------|---------|
| Grupos | 491/00 | 23F OPKA | 6B OPKA | 472/96 |
| | (PspA1) | (PspA2) | (PspA3) | (PspA4) |
| Salina | 57 | 132 | 107 | 34 |
| wP | 61 | 144 | 94 | 37 |
| rPspA1 | 194 | 479 | 112 | 47 |
| rPspA2 | 55 | 158 | 64 | 37 |
| rPspA3 | 59 | 74 | 241 | 37 |
| rPspA4 | 62 | 180 | 228 | 263 |
| rPspA5 | 55 | 139 | 88 | 37 |

Tabela 6- Mediana da intensidade de fluorescência do total de bactérias.

4.5 Avaliação de co-colonização utilizando isolados clínicos expressando diferentes PspAs

Para a avaliação de isolados clínicos em modelo de co-colonização da nasofaringe de camundongos, foram isolados clones do sorotipo 6B expressando PspA1 (491/00), PspA2 (371/00), PspA3 (679/99) e PspA4 (472/96), resistentes aos seguintes antibióticos: optoquina (OPT), estreptomicina (STR) e trimetoprim (TMP). Clones de 491/00 resistentes à OPT, de 371/00 resistentes à STR, de 679/99 resistentes à OPT e 472/96, que se mostrou naturalmente resistente ao TMP, foram selecionados para a colonização experimental. A partir da recuperação de bactérias de lavados nasais 5 dias após o desafio de camundongos C57BL/6 com 10⁶ UFCs em 10 µL por via nasal, foi possível observar uma menor recuperação de UFCs de 491/00 OPT^R (PspA1) em placas com OPT, quando comparado ao plaqueamento sem antibiótico (Figura 20A). Não foram recuperadas bactérias de animais inoculados com o isolado 371/00 STR^R (PspA2). Níveis comparáveis de UFCs foram recuperados do isolado 679/99 OPT^R (PspA3) plaqueado com ou sem OPT (Figura 20B). Também foram recuperados níveis comparáveis de UFCs do isolado 472/96 TMP^R (PspA4) plaqueado com ou sem TMP (Figura 20C).



Figura 20- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos colonizados experimentalmente com 491/00 OPT^R (PspA1), 679/99 OPT^R (PspA3) ou 472/96 TMP^R (PspA4). Camundongos C57BL/6 foram inoculados por via nasal com os isolados 491/00 OPT^R (PspA1) (A), 679/99 OPT^R (PspA3) (B) ou 472/96 TMP^R (PspA4) (C) e as bactérias foram recuperadas do lavado nasal 5 dias após a colonização em placa sem antibiótico (S/A) ou contendo os antibióticos indicados.

Para a avaliação da co-colonização com isolados expressando PspA de família 1 (PspA1, PspA2) e de família 2 (PspA3, PspA4), decidiu-se avaliar o isolado 491/00 (PspA1) original, sem resistência a antibióticos. A Figura 21 mostra a recuperação de bactérias no lavado nasal 5 dias após a colonização experimental dos camundongos. A quantidade de bactérias recuperadas foi bastante semelhante àquela observada com o isolado 491 OPT^R (PspA1) plaqueado sem antibiótico (Figura 20A). Não foram recuperadas UFCs em placas contendo OPT ou TMP. Desse modo, as misturas de bactérias escolhidas para realização dos experimentos de co-colonização foram 491/00 (PspA1) + 679/99 OPT^R (PspA3) e 491/00 (PspA1) + 472/96 TMP^R (PspA4).



Figura 21- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos colonizados experimentalmente com 491/00 (PspA1). Camundongos C57BL/6 foram inoculados por via nasal com o isolado 491/00 (PspA1) e as bactérias foram recuperadas do lavado nasal 5 dias após a colonização em placa sem antibiótico.

A avaliação de co-colonização foi então verificada em animais colonizados experimentalmente com $5x10^5$ UFCs de 491/00 (PspA1) + $5x10^5$ UFCs de 679/99 OPT^{R} (PspA3) ou 5x10⁵ UFCs de 491/00 (PspA1) + 5x10⁵ UFCs de 472/96 TMP^R (PspA4) em 10 µL por via nasal. As Figuras 22A a 22D mostram a recuperação de bactérias 5 e 7 dias após o desafio em placas com ou sem antibiótico. Não foi possível recuperar bactérias resistentes à OPT quando foi inoculada a mistura 491/00 (PspA1) + 679/99 OPT^R (PspA3) (Figuras 22A e 22C). Assim, a linhagem 491/00 (PspA1) parece levar à eliminação da linhagem 679/99 OPT^R (PspA3). Outra possibilidade seria a perda total de resistência à OPT, o que parece ser improvável, uma vez que já havíamos conseguido recuperar essa bactéria em lavados realizados 5 dias após o desafio (Figura 20B). Já quando a mistura 491/00 (PspA1) + 472/96 TMP^R (PspA4) foi inoculada, foram recuperadas bactérias em placas contendo ou não TMP 5 e 7 dias após o desafio (Figuras 22B e 22D). Uma quantidade um pouco menor de bactérias resistentes ao TMP foi recuperada no dia 5. No dia 7, um animal não apresentou bactérias resistentes ao antibiótico. As Figuras 22E e 22F mostram a quantidade de bactérias de cada linhagem recuperada nos lavados nasais, calculando-se a quantidade de 491/00 (PspA1) como sendo a quantidade de bactérias recuperadas na placa sem antibiótico menos a quantidade de bactérias na placa com TMP. Esses dados levaram à escolha da mistura 491/00 (PspA1) + 472/96 TMP^R (PspA4) para os experimentos de imunização com diferentes PspAs.



Figura 22- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos colonizados experimentalmente com as misturas 491/00 (PspA1) + 679/99 OPT^R (PspA3) ou 491/00 (PspA1) + 472/96 TMP^R (PspA4). Camundongos C57BL/6 foram inoculados por via nasal com as misturas dos isolados 491/00 (PspA1) + 679/99 OPT^R (PspA3) (A e C) ou 491/00 (PspA1) + 472/96 TMP^R (PspA4) (B, D, E e F). As bactérias foram recuperadas do lavado nasal 5 (A, C e E) ou 7 (B, D e F) dias após a colonização experimental. A quantidade de UFCs recuperadas em placa sem antibiótico (S/A) ou com os antibióticos indicados (A-D) ou a quantidade de UFCs das linhagens 491/00 (PspA1) e 472/96 TMP^R (PspA4) (E-F) são mostrados.

Sete grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados com 2 doses de rPspA (5 µg) mais a vacina celular pertussis (wP) como adjuvante nas duas doses por via nasal. Após 3 semanas da última imunização, os animais foram desafiados

com a mistura $5x10^5$ UFCs de 491/00 (PspA1) + $5x10^5$ UFCs de 472/96 OPT^R (PspA4). Os lavados nasais para a recuperação das bactérias foram realizados 5 dias após o desafio. Foi possível observar uma menor quantidade de UFCs de 472/96 (PspA4) recuperados quando comparado com UFCs 491/00 (PspA1). Os camundongos imunizados com wP, rPspA1, rPspA3 e rPspA4 apresentaram redução estatisticamente significativa de colonização com os dois isolados quando comparados com o grupo salina. Os animais imunizados com rPspA1 (P \leq 0,05) apresentaram ainda uma diminuição estatisticamente significativa de colonização ao grupo adjuvante wP, enquanto que animais imunizados com rPspA4 (P \leq 0,05) apresentaram diferença estatisticamente significativa de colonização ao grupo adjuvante wP, enquanto que animais imunizados com rPspA4 (P \leq 0,05) apresentaram diferença estatisticamente significativa de colonização ao grupo adjuvante wP, enquanto que animais imunizados com rPspA4 (P \leq 0,05) apresentaram diferença estatisticamente significativa de colonização ao grupo adjuvante wP (Figura 23).



Figura 23- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos desafiados com mistura de isolados 491/00 (PspA1) + 472/96 TMP^R (PspA4) – rPspA1 a rPspA5. Camundongos imunizados com as formulações indicadas foram desafiados com uma mistura de isolados do sorotipo 6B e expressando diferentes PspAs. A recuperação dos isolados 491/00 (PspA1) (A) e 472/96 TMP^R (PspA4) (B) no lavado nasal dos animais realizado 5 dias após o desafio é mostrada. * e [#] indicam diferença estatisticamente significativa com salina e com wP, respectivamente (One-way ANOVA, Tukey's Multicomparison Test- * ou [#] P≤0,05; ** P≤0,01; *** P≤0,001). Dados obtidos em 2 experimentos independentes.

A partir dos dados anteriores, foi possível observar que os antígenos rPspA1 e rPspA4 parecem possuir um maior potencial de proteção contra os isolados 491/00 (PspA1) e 472/96 OPT^R (PspA4). Assim, a mistura dos dois antígenos (rPspA1+rPspA4) ou uma primeira dose de rPspA1 seguida de uma segunda dose de rPspA4 (rPspA1/rPspA4) foi testada para avaliar a eficiência desses antígenos na redução da colonização pelos dois isolados de pneumococo. A Figura 24 mostra que tanto a imunização com rPspA1+rPspA4 como com rPspA1/rPspA4 levam a uma diminuição estatisticamente significativa da colonização pelos dois isolados de sorotipo 6B em relação ao grupo salina.



Figura 24- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos desafiados com mistura de isolados 491/00 (PspA1) + 472/96 TMP^R (PspA4) – rPspA1+rPspA4 e rPspA1/rPspA4. Camundongos imunizados com as formulações indicadas foram desafiados com uma mistura de isolados do sorotipo 6B e expressando diferentes PspAs. A recuperação dos isolados 491/00 (PspA1) (A) e 472/96 TMP^R (PspA4) (B) no lavado nasal dos animais realizado 5 dias após o desafio é mostrada. * indica diferença estatisticamente significativa com salina (One-way ANOVA, Tukey's Multicomparison Test-** P≤0,01).

Em seguida, foi avaliada a eficácia da imunização com os diferentes rPspAs contra co-colonização com dois isolados de sorotipos diferentes, 6B e 23F, e expressando PspAs de família 1 ou família 2. A colonização de animais não

imunizados foi testada com misturas dos isolados 472/96 TMP^R (6B, PspA4), 6B OPKA SPEC^R (6B, PspA3), HU23F (23F, PspA2) e 23F OPKA (23F, PspA2) (Figura 25). A mistura escolhida para os experimentos de desafio de animais imunizados com diferentes rPspAs foi 6B OPKA SPEC^R (PspA3) e 23F OPKA (PspA2), por serem da mesma origem e ainda não utilizadas neste trabalho. A Figura 26 mostra que houve diminuição estatisticamente significativa na colonização pelo isolado 23F OPKA (PspA2) em camundongos imunizados com rPspA1 e rPspA4 em relação ao grupo salina. Também foi possível observar uma redução estatisticamente significativa na colonização pelo isolado 23F isolado 23F OPKA (PspA2) em camundongos imunizados com rPspA1 e rPspA4 em relação ao grupo salina. Também foi possível observar uma redução estatisticamente significativa na colonização pelo isolado 6B OPKA SPEC^R (PspA3) em animais imunizados com rPspA4.



Figura 25- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos colonizados experimentalmente com mistura de isolados dos sorotipos 6B e 23F. Camundongos foram inoculados com uma mistura de isolados HU23F + 6B OPKA SPEC^R (A), 23F OPKA + 6B OPKA SPEC^R (B), HU23F + 472/96 TMP^R (C) e 23F OPKA + 472/96 TMP^R (D) que expressam diferentes PspAs. A recuperação dos isolados no lavado nasal dos animais realizado 5 dias após o desafio é mostrada.



Figura 26- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos imunizados com rPspAs e desafiados com mistura de isolados dos sorotipos 6B e 23F. Camundongos imunizados com as formulações indicadas foram desafiados com uma mistura de isolados de sorotipos diferentes e expressando diferentes PspAs. A recuperação dos isolados 23F OPKA (PspA2) (A) e 6B OPKA SPEC^R (PspA3) (B) no lavado nasal dos animais realizado 5 dias após o desafio é mostrada. * indica diferença estatisticamente significativa com salina (One-way ANOVA, Tukey's Multicomparison Test- * P≤0,05; **P≤0,01).

Em todos experimentos de desafio foi observada uma diminuição de colonização em animais inoculados apenas com o adjuvante wP em comparação com o grupo salina, dificultando a avaliação do efeito da imunização com as diferentes proteínas. Decidimos então analisar a eficácia da imunização com os diferentes rPspA1, rPspA4 e a mistura de rPspA1+rPspA4 utilizando o adjuvante wP apenas na primeira dose contra co-colonização com os isolados 6B OPKA SPEC^R (PspA3) e 23F OPKA (PspA2). Incialmente, foi realizada a quantificação de anticorpos IgG anti-rPspA2 e anti-rPspA3 por ELISA para comparação da imunização com o adjuvante nas duas doses. A Figura 27 mostra que camundongos

imunizados com rPspA1 e rPspA1+rPspA4 apresentaram aumento estatisticamente significativo no título de anticorpos IgG anti-rPspA2, enquanto que animais imunizados com rPspA4 e rPspA1+rPspA4 apresentaram aumento estatisticamente significativo no título de anticorpos IgG anti-rPspA3. A imunização com rPspA1+rPspA4 induziu níveis semelhantes de anticorpos IgG anti-rPspA2 e anti-rPspA3 quando se compara imunização com rPspA1 ou rPspA4, respectivamente. Além disso, níveis comparáveis de IgG anti-PspA foram detectados quando se compara a imunização com adjuvante nas duas doses ou apenas na primeira dose (Figura 18).



Figura 27- Indução de anticorpos IgG anti-rPspA 2 e anti-rPspA3. Camundongos C57BL/6 foram imunizados por via nasal com as formulações descritas utilizando wP como adjuvante na primeira dose e anticorpos IgG anti-rPspA2 (A) e anti-rPspA3 (B) foram detectados por ELISA. * indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo salina (Oneway ANOVA, Tukey's Multicomparison Test- *** P≤0,001).

Os animais imunizados com o adjuvante apenas na primeira dose foram então desafiados com a mistura dos isolados 6B OPKA SPEC^R (PspA3) e 23F OPKA (PspA2). A Figura 28 mostra que não houve diminuição estatisticamente significativa na colonização pelo isolado 23F OPKA (PspA2) ou pelo isolado 6B OPKA SPEC^R (PspA3).



Figura 28- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos imunizados com rPspAs e wP na primeira dose, e desafiados com mistura de isolados dos sorotipos 6B e 23F. Camundongos imunizados com as formulações indicadas foram desafiados com uma mistura de isolados de sorotipos diferentes e expressando diferentes PspAs. A recuperação dos isolados 23F OPKA (PspA2) (A) e 6B OPKA SPEC^R (PspA3) (B) no lavado nasal dos animais realizado 5 dias após o desafio é mostrada. * indica diferença estatisticamente significativa com salina (One-way ANOVA, Tukey's Multicomparison Test- * P≤0,05).

Os experimentos representados pelas Figuras 26 e 28 foram analisados juntos (Figura 29). É possível observar diminuição estatisticamente significativa na colonização pelo isolado 23F OPKA (PspA2) em animais imunizados com rPspA1 e rPspA4. Animais imunizados com rPspA4 e rPspA1+rPspA4 apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa da colonização pelo isolado 6B OPKA SPEC^R (PspA3) em relação ao grupo salina.



Figura 29- Recuperação de pneumococos da nasofaringe de camundongos desafiados com mistura de isolados 23F OPKA (PspA2) + 6B OPKA SPEC^R (PspA3) – rPspA1 a rPspA5. Camundongos imunizados com as formulações indicadas foram desafiados com uma mistura de isolados do sorotipo 6B e 23F expressando diferentes PspAs. A recuperação dos isolados 23F OPKA (PspA2) (A) e 6B OPKA SPEC^R (PspA3) (B) no lavado nasal dos animais realizado 5 dias após o desafio é mostrada. * indica diferença estatisticamente significativa com salina (One-way ANOVA, Tukey's Multicomparison Test- * P≤0,05; ** P≤0,01). Dados obtidos em 2 experimentos independentes.

A Figura 30 mostra a análise das proporções do número de UFCs do isolado 491/00 (PspA1) sobre o isolado 472/96 TMP^R (PspA4) (família 1/família 2) (Figura 30A) e do isolado 23F OPKA (PspA2) sobre o isolado 6B OPKA SPEC^R (PspA3) (família 1/família 2) (Figura 30B). Comparando os grupos controles, salina e wP, com os grupos imunizados com rPspA, não se observa um aumento exacerbado de um isolado com relação ao outro, não havendo nenhuma diferença estatística entre os

grupos nas Figuras 30A e 30B. Aparentemente, há um controle da co-colonização da nasofaringe entre os isolados 491/00 (PspA1) e 472/96 TMP^R (PspA4), e dos isolados 23F OPKA (PspA2) e 6B OPKA SPEC^R (PspA3) nos grupos imunizados com as variantes de rPspA.



Figura 30- Razão das UFCs de pneumococos recuperados da nasofaringe de camundongos imunizados e desafiados com mistura de isolados. Razão entre UFCs dos isolados de sorotipo 6B 491/00 e 472/96 (A) e dos isolados 23F OPKA e 6B OPKA (B) recuperados da nasofaringe de camundongos imunizados com as formulações indicadas é mostrada.

4.6 Quantificação de isolados dos sorotipos 6B e 23F por PCR quantitativo em tempo real

Para avaliar um modelo de co-colonização com dois isolados de pneumococo de sorotipos diferentes sem o uso de seleção por antibióticos, foram feitos diversos experimentos para estabelecer a quantificação de bactérias dos sorotipos 6B e 23F por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando oligonucleotídeos específicos para esses sorotipos (Tabela 4) e com condições já descritas. Após várias modificações do protocolo, foi realizada uma comparação da quantidade de bactérias recuperadas em placa de ágar-sangue e a estimativa obtida a partir do qPCR. Essa estimativa foi baseada em uma curva padrão com quantidade definida de DNA genômico de cada uma das linhagens. A Tabela 7 mostra que foi possível conseguir uma estimativa razoável da quantidade de bactérias do sorotipo 6B por gPCR, mas não do sorotipo 23F. Assim, não foi possível estabelecer a técnica para realizarmos experimentos de co-colonização de isolados não resistentes a antibióticos.

| | e | 6B | 23F | | |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--|
| | UFC em placa | UFC por qPCR | UFC em placa | UFC por qPCR | |
| Animal 1 | 4950 | 7807 | 4050 | 44 | |
| Animal 2 | 3182 | 6687 | 500 | 32 | |
| Animal 3 | 3904 | 14657 | 6309 | 3765 | |
| Animal 4 | 186752 | 164646 | 126432 | 79 | |
| Animal 5 | 5478 | 4301 | 3251 | 1008 | |
| Animal 6 | 1799 | 9004 | 3482 | 40 | |

Tabela 7– Comparação entre UEC recuperada em plaça e estimativa por gPCR

5 DISCUSSÃO

A proteína PspA é um dos antígenos proteicos de pneumococos mais bem estudados. Como um fator de virulência, o PspA é importante na evasão do sistema imune a partir da inibição da deposição de complemento na superfície bacteriana e ligação à proteína bactericida de mucosa apolactoferrina (Ren et al., 2004; Shaper et al., 2004; Tu et al., 1999). Vários estudos demostraram que diversas abordagens vacinais com PspA foram eficazes contra infecções por pneumococos em modelo animal como, vacinas de DNA (Ferreira et al., 2006), entrega de antígeno por Salmonella enterica e Lactobacillus casei (Campos et al., 2008; Xin et al., 2009) ou combinação de proteínas recombinantes com agonistas de receptores toll-like ou citocinas (Arulanandam et al., 2001; Oma et al., 2009). Os resultados dessas publicações indicam uma forte correlação entre o aumento da proteção em modelos animais e a indução de respostas do tipo Th1, caracterizada pelos altos níveis de anticorpos IgG anti-PspA e produção de IFN-y. Outro estudo mostrou que, utilizando o PspA via imunização nasal, houve um aumento da proteção e secreção de IL-17 por células do pulmão e baço, após um desafio letal em camundongos (Ferreira et al., 2009). Tais dados provam que o PspA é um candidato vacinal importante contra doenças pneumocócicas.

O Janus Cassette (JC) foi utilizado para obtenção de linhagens derivadas TIGR4-∆*pspA* e TIGR4 expressando PspA1 ou PspA4 a partir de um mesmo *background* genético, para avaliar a eficácia das diferentes variantes de PspAs em um modelo de co-colonização da nasofaringe de camundongos. Tal cassete permite o nocaute e a troca alélica em *S. pneumoniae* através de seleção sequencial positiva (Kn^R e STR^S) e negativa (Kn^S e STR^R). No entanto, a ocorrência de revertentes espontâneos do JC, já descrita na literatura (Sung et al., 2001), levou a um grande número de falso-positivos durante a seleção por resistência à STR da segunda recombinação. Nosso grupo já havia utilizado esse cassete para nocautear o gene *pspA* da linhagem não-capsulada Rx1. A troca alélica foi realizada com sucesso, gerando Rx1-*pspA1* e Rx1-*pspA4* (Miyaji et al., 2015). O sucesso da transformação da linhagem Rx1 utilizando o JC é compreensível, pois essa linhagem não apresenta cápsula.

Para melhorar a eficiência da seleção negativa, um estudo descreveu um novo cassete, o *Sweet Janus Cassette* (SWJ), para realização de troca alélica em pneumococo. Além do marcador de resistência à STR, esse novo cassete contém o gene *sacB* de *Bacillus subtilis*, um marcador adicional contra-selecionável, que confere sensibilidade à sacarose em algumas bactérias Gram-positivas (Li et al., 2014). Assim, a segunda recombinação possui dupla seleção de resistência à STR e à sacarose para a excisão do SWJ e inserção do novo alelo do gene. De acordo com esse estudo, o sistema demonstrou que a quantidade de falso-positivos para o SWJ é 100 vezes menor do que para o JC durante a seleção negativa. Os nossos resultados mostraram a obtenção da bactéria com o gene *pspA* deletado (TIGR4- $\Delta pspA$), porém, mesmo utilizando o SWJ, a troca alélica não foi bem sucedida, pois ainda ocorreram linhagens falso-positivas, não havendo a expressão de PspA1 ou PspA4. Provavelmente, o isolado TIGR4 utilizado em nosso laboratório não seja adequado para estas construções.

Vetores pAE-6xHis contendo os fragmentos gênicos das diferentes variantes de *pspA1* a *pspA5* foram utilizados para transformar células de *E. coli*, que foram cultivadas e induzidas para expressão das proteínas recombinantes. A análise dos cultivos por SDS-PAGE 12% revelou que todas as proteínas recombinantes foram expressas e que as bandas observadas no gel apresentavam massa molecular acima do predito, como já havia sido descrito na literatura (Yother, Briles, 1992). Os processos de expressão e purificação dos PspAs recombinantes (rPspA1 ao rPspA5) são bem estabelecidos pelo nosso grupo (Ferreira et al., 2006; Moreno et al., 2010; Oliveira et al., 2010; Vadesilho et al., 2012). Figueiredo e colaboradores mostraram, com ensaios de dicroísmo circular e de ligação à lactoferrina, que a proteína recombinante PspA4Pro manteve sua estrutura secundária e atividade biológica preservada após a purificação, e estabilidade quando submetida a variações de temperatura e pH (Figueireido et al., submetido).

Após a purificação das proteínas recombinantes, as mesmas foram utilizadas para imunização de camundongos por via nasal com o adjuvante wP. O adjuvante wP, além de ser um componente da vacina DTPw (Difteria-Tétano-Pertussis celular) produzida pelo Instituto Butantan, induz uma resposta imune protetora contra o pneumococo, caracterizada por altos níveis de anticorpos (Oliveira et al., 2010) e

resposta mediada por células com perfil Th1/Th17 (Lima et al., 2012), quando associada à PspA recombinante.

Os anticorpos anti-PspAs contidos nos soros obtidos após as imunizações foram dosados por ELISA e utilizados na análise de ligação de anticorpos à superfície da bactéria por citometria de fluxo. Os dados de ELISA mostraram que camundongos imunizados com rPspA1 apresentaram aumento no título de anticorpos IgG anti-rPspA1, anti-IgG-rPspA2 e anti-rPspA4, e que animais imunizados com rPspA4 apresentaram aumento no título de anticorpos IgG antirPspA3 e anti-rPspA4. Animais imunizados com rPspA2 e rPspA3 apresentaram aumento de anticorpos apenas contra rPspA do mesmo clado. Com a análise da capacidade de ligação dos anticorpos à superfície de pneumococos intactos por citometria de fluxo, foi verificado que somente anticorpos do grupo imunizado com rPspA1 foram capazes de ligar-se eficientemente à bactéria 491/00 (PspA1) e à bactéria 23F OPKA (PspA2). Anticorpos do grupo imunizado com rPspA3 e rPspA4 ligaram-se eficientemente à bactéria 6B OPKA que expressa PspA3, enquanto que somente anticorpos do grupo imunizado com rPspA4 se ligaram eficientemente à bactéria 472/96 que expressa PspA4. De forma geral, os resultados de citometria de fluxo estão de acordo com os ensaios de ELISA. Estas duas análises mostram que uma mistura de rPspA1 (família 1) mais rPspA4 (família 2) seria capaz de induzir anticorpos que reconhecem isolados de pneumococos expressando diferentes PspAs. Uma análise semelhante já havia sido feita em nosso laboratório com soros obtidos de camundongos imunizados com diferentes rPspAs por via subcutânea utilizando hidróxido de alumínio como adjuvante (Moreno et al., 2010). Nesse caso, foi observada uma maior reatividade cruzada tanto por ELISA quanto por análise de diferentes isolados de pneumococo por citometria de fluxo. Além disso, foi demonstrada uma capacidade de proteção cruzada entre famílias, já que a imunização com rPspA4 e rPspA5 foi capaz de induzir proteção contra um desafio intranasal letal com isolados expressando PspA de família 1 ou família 2. Proteção contra desafio de colonização não foi avaliada nesse trabalho já publicado.

Nosso grupo já havia avaliado a imunização com rPspA5 por via nasal utilizando wP como adjuvante e foi demonstrada redução na colonização com isolado de sorotipo 6B expressando PspA1 (Oliveira et al., 2010). É importante ressaltar que os animais receberam 6 doses das formulações vacinais nesse
primeiro trabalho e que agora utilizamos apenas 2 doses. O trabalho agora apresentado expande essa análise, com a imunização de camundongos com diferentes rPspAs e com a utilização de um modelo de co-colonização com diferentes isolados de pneumococo. Com o propósito de mimetizar uma situação natural de exposição e colonização por diferentes pneumococos, o que é comum principalmente em crianças, e avaliar o impacto da pressão seletiva da vacinação, camundongos foram desafiados com mistura de isolados do sorotipo 6B ou de isolados do sorotipo 6B mais 23F após imunização com diferentes PspAs. Primeiramente, os animais foram desafiados com a mistura dos isolados de sorotipo 6B expressando PspA de família 1 ou família 2 (491/00 (PspA1) e 472/96 (PspA4 -TMP^R)). Cinco dias após o desafio, foram realizados lavados nasais para a recuperação das bactérias. Camundongos imunizados com wP, rPspA1, rPspA3 e rPspA4 apresentaram diminuição da colonização com os dois isolados quando comparados com o grupo salina. Animais imunizados com rPspA1 apresentaram ainda redução de colonização pelo isolado 491/00 (PspA1) em relação ao grupo adjuvante wP, enquanto que animais imunizados com rPspA4 apresentaram diminuição da colonização com o isolado 472/96 (PspA4) em relação ao grupo adjuvante wP. Esses resultados mostraram que, aparentemente, rPspA1 e rPspA4 são os antígenos com maior potencial de proteção contra os dois isolados. Sendo assim, foi testada a mistura dos dois antígenos (rPspA1+rPspA4) ou uma dose de rPspA1 seguida de uma dose de rPspA4 (rPspA1/rPspA4), pois seriam mais eficientes na diminuição da colonização pelos dois isolados de pneumococo. Tanto a imunização com rPspA1+rPspA4 como a imunização com rPspA1/rPspA4 diminuíram a colonização pelos dois isolados de sorotipo 6B.

Imunização com rPspA1, rPspA4 ou rPspA1+rPspA4 contra co-colonização com dois isolados de sorotipos diferentes (6B e 23F) e expressando PspAs de família 1 ou família 2 mostrou uma redução na colonização pelo isolado 6B OPKA SPEC^R (PspA3) em camundongos imunizados rPspA4 e rPspA1+rPspA4. Foi observada ainda uma redução de colonização pelo isolado 23F OPKA (PspA2) em animais imunizados com rPspA1 e rPspA4.

Foi realizada uma análise para se avaliar a proporção de isolados com PspA de família 1 e família 2 recuperados da nasofaringe de animais imunizados com as diferentes formulações contendo rPspAs e desafiados nos modelos de cocolonização. Comparando os grupos controles, salina e wP, com os grupos imunizados com rPspA, não se observa um aumento exacerbado de um isolado com relação ao outro. Esses dados indicam que a pressão seletiva de vacinas baseadas em PspA não seria tão exacerbada quanto àquela observada com o uso das vacinas polissacarídicas conjugadas, diminuindo a chance de substituição de isolados mais prevalentes. O uso da mistura rPspA1+rPspA4, contendo rPspA de família 1 e família 2, proporcionaria uma garantia ainda maior contra o fenômeno de substituição causada por vacinação.

Neste trabalho, foi avaliada a indução de anticorpos IgG séricos anti-PspA e o papel desse anticorpos na proteção contra pneumococo já foi demonstrada em experimentos de imunização passiva. Nestes trabalhos, a inoculação de soro de animais ou voluntários imunizados com rPspA foi capaz de induzir proteção em modelos de infecção letal e colonização por pneumococo em camundongos naive (Briles et al., 2000; Ferreira et al., 2010; Oliveira et al., 2010). No entanto, o uso da vacina wP como adjuvante leva a um aumento não apenas de anticorpos contra a proteína co-administrada, mas induz também uma resposta celular específica com perfil Th1/Th17 (Lima et al., 2012). Já foi demonstrado que imunidade protetora contra colonização de camundongos por pneumococo pode ser mediada unicamente por IL-17A (Lu et al., 2008). A secreção de IL-17A levaria ao recrutamento de neutrófilos ao local da infecção, levando à fagocitose das bactérias (Zhang et al., 2009). No caso da imunização com rPspA com wP como adjuvante em nosso modelo, haveria a indução de células T-CD4⁺ com perfil Th17 específicas contra PspA. Quando em contato com pneumococos após o desafio, essas células secretariam IL-17A, levando a um influxo de neutrófilos. Os neutrófilos recrutados fagocitariam então os pneumococos de maneira inespecífica, independente do antígeno expresso pela bactéria (Trzcinski et al., 2008). Deste modo, em nosso modelo, a indução de células CD4⁺ Th17 específicas contra PspA de um clado levaria a um aumento de fagocitose de pneumococos expressando diferentes PspAs. Assim, tanto anticorpos IgG anti-PspA com maior reatividade cruzada como secreção de IL-17A poderiam explicar a manutenção de um equilíbrio entre pneumococos expressando PspA de família 1 e de família 2 no modelo utilizado de co-colonização após imunização com diferentes rPspAs utilizando wP como adjuvante.

Finalmente, para analisar a possibilidade de quantificar os sorotipos 6B e 23F em um modelo de co-colonização da nasofaringe de camundongos foi utilizada a técnica de qPCR. A comparação e análise entre a quantificação de UFC da cultura e os resultados de qPCR são importantes e complementares para os estudos de episódios de colonização, por serem informações consideráveis para o desenvolvimento de futuras vacinas no qual a densidade ou duração da colonização por pneumococo são relevantes (Gritzfeld et al., 2014). Porém, não foi possível estabelecer a técnica de qPCR para o modelo utilizado neste trabalho.

6 CONCLUSÃO

A proteína PspA é um importante candidato vacinal contra infecções causadas pelo *S. pneumoniae*. Neste trabalho, as diferentes variantes de PspAs, principalmente rPspA1 e rPspA4, se mostraram eficazes no controle da co-colonização da nasofaringe de camundongos utilizando misturas de isolados de sorotipo 6B e 23F expressando PspA1, PspA2, PspA3 e PspA4.

Portanto, os experimentos deste projeto trazem uma análise ampla da cobertura vacinal contra pneumococo das diferentes formulações contendo variantes do antígeno PspA, já que uma vacina capaz de controlar a colonização por bactérias expressando diferentes PspAs levaria a uma menor probabilidade de alteração nos isolados predominantes que circulam na população, evitando a substituição de sorotipos prevalentes e protegendo contra a maioria dos isolados de pneumococo.

REFERÊNCIAS*

Adetifa IM, Antonio M, Okoromah CA, Ebruke C, Inem V, Nsekpong D, et al. Prevaccination nasopharyngeal pneumococcal carriage in a Nigerian population: epidemiology and population biology. PloS One. 2012;7(1):e30548.

Aida Y, Pabst MJ. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. J Immunol Methods. 1990 Sep;132(2):191-5.

Aliberti S, Mantero M, Mirsaeidi M, Blasi F. The role of vaccination in preventing pneumococcal disease in adults. Clin Microbiol Infect. 2014 May;20 Suppl 5:52-8.

Bergey DH, Breed RS. Bergey's manual of determinative bacteriology. American Society for Microbiology. 7th ed. Baltimore; Williams & Wilkins Co.; 1957. 1094 p.

Andrade AL, Ternes YM, Vieira MA, Moreira WG, Lamaro-Cardoso J, Kipnis A, et al. Direct effect of 10-valent conjugate pneumococcal vaccination on pneumococcal carriage in children Brazil. PLoS One. 2014;9(6):e98128.

Arulanandam BP, Lynch JM, Briles DE, Hollingshead S, Metzger DW. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A and interleukin-12 augments antibody-mediated opsonization and protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. Infection and Immunity. 2001 Nov;69(11):6718-24

Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, Cortimiglia M, Canessa C, Becciolini L, et al. Realtime PCR is more sensitive than multiplex PCR for diagnosis and serotyping in children with culture negative pneumococcal invasive disease. PLoS One. 2010;5(2):e9282.

Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. The Lancet Infectious diseases. 2004 Mar;4(3):144-54.

Brandileone MC, de Andrade AL, Di Fabio JL, Guerra ML, Austrian R. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. J Infect Dis. 2003 Apr;187(8):1206-12.

Briles DE, Ades E, Paton JC, Sampson JS, Carlone GM, Huebner RC, et al. Intranasal immunization of mice with a mixture of the pneumococcal proteins PsaA and PspA is highly protective against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2000 Feb;68(2):796-800.

Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, van Ginkel FW, et al. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis. 2003 Aug;188(3):339-48.

^{*}De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [Updated 2014 Dec]. Available from: http://www.icmje.org

Brooks-Walter A, Briles DE, Hollingshead SK. The pspC gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. Infect Immun. 1999 Dec;67(12):6

Broome CV, Facklam RR. Epidemiology of clinically significant isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Rev Infect Dis. 1981 Mar-Apr;3(2):277-81.

Bryant KA, Block SL, Baker SA, Gruber WC, Scott DA, Group PIS. Safety and immunogenicity of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. Pediatrics. 2010 May;125(5):866-75.

Campos IB, Darrieux M, Ferreira DM, Miyaji EN, Silva DA, Areas AP, et al. 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 / Institut Pasteur. 2008 Apr;10(5):481-8.

Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases. In: Pneumococcal disease. Washington, DC: Public Health Foundation 2008.

Constenla DO. Economic impact of pneumococcal conjugate vaccination in Brazil, Chile, and Uruguay. Rev Panam Salud Publica. 2008 Aug;24(2):101-12.

Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail MA, Burton J, van der Linden M, et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. Science. 2011 Jan;331(6016):430-4.

Croucher NJ, Mitchell AM, Gould KA, Inverarity D, Barquist L, Feltwell T, et al. Dominant role of nucleotide substitution in the diversification of serotype 3 pneumococci over decades and during a single infection. PLoS Genet. 2013;9(10):e1003868.

Dagan R, Kayhty H, Wuorimaa T, Yaich M, Bailleux F, Zamir O, et al. Tolerability and immunogenicity of an eleven valent mixed carrier *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide-diphtheria toxoid or tetanus protein conjugate vaccine in Finnish and Israeli infants. Pediatr Infect Dis J. 2004 Feb;23(2):91-8.

Darrieux M, Moreno AT, Ferreira DM, Pimenta FC, de Andrade AL, Lopes AP, et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. J Med Microbiol. 2008 Mar;57(Pt 3):273-8.

Domingues CM, Verani JR, Montenegro Renoiner EI, de Cunto Brandileone MC, Flannery B, de Oliveira LH, et al. Effectiveness of ten-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease in Brazil: a matched case-control study. Lancet Respir Med. 2014 Jun;2(6):464-71.

dos Santos SR, Passadore LF, Takagi EH, Fujii CM, Yoshioka CR, Gilio AE, et al. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with

invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. Vaccine. 2013 Dec;31(51):6150-4.

Felmingham D, Canton R, Jenkins SG. Regional trends in beta-lactam, macrolide, fluoroquinolone and telithromycin resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates 2001-2004. The Journal of infection. 2007 Aug;55(2):111-8.

Ferreira DM, Miyaji EN, Oliveira ML, Darrieux M, Areas AP, Ho PL, et al. DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein. Journal of medical microbiology. 2006 Apr;55(Pt 4):375-8.

Ferreira DM, Darrieux M, Silva DA, Leite LC, Ferreira JM, Jr., Ho PL, et al. 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 : CVI. 2009 May;16(5):636-45.

Ferreira DM, Oliveira ML, Moreno AT, Ho PL, Briles DE, Miyaji EN. Protection against nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). Microb Pathog. 2010 Jun;48(6):205-13.

Franco CM, Andrade AL, Andrade JG, Almeida e Silva S, Oliveira CR, Pimenta FC, et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. Pediatr Infect Dis J. 2010 Jan;29(1):77-9.

Frazão N, Brito-Avô A, Simas C, Saldanha J, Mato R, Nunes S, et al. Effect of the seven-valent conjugate pneumococcal vaccine on carriage and drug resistance of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children attending day-care centers in Lisbon. Pediatr Infect Dis J. 2005 Mar;24(3):243-52.

Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, et al. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):871-99.

Gritzfeld JF, Cremers AJ, Ferwerda G, Ferreira DM, Kadioglu A, Hermans PW, et al. Density and duration of experimental human pneumococcal carriage. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2014 Dec;20(12):O1145-51.

Hackel M, Lascols C, Bouchillon S, Hilton B, Morgenstern D, Purdy J. Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. Vaccine. 2013 Oct;31(42):4881-7.

Hicks LA, Harrison LH, Flannery B, Hadler JL, Schaffner W, Craig AS, et al. Incidence of pneumococcal disease due to non-pneumococcal conjugate vaccine (PCV7) serotypes in the United States during the era of widespread PCV7 vaccination, 1998-2004. J Infect Dis. 2007 Nov;196(9):1346-54.

Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2000 Oct;68(10):5889-900.

Huang SS, Platt R, Rifas-Shiman SL, Pelton SI, Goldmann D, Finkelstein JA. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. Pediatrics. 2005 Sep;116(3):e408-13.

Kaplan SL, Barson WJ, Lin PL, Romero JR, Bradley JS, Tan TQ, et al. Early trends for invasive pneumococcal infections in children after the introduction of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine. Pediatr Infect Dis J. 2013 Mar;32(3):203-7.

Kim SH, Song JH, Chung DR, Thamlikitkul V, Yang Y, Wang H, et al. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. Antimicrobial agents and Chemotherapy. 2012 Mar;56(3):1418-26.

Li Y, Thompson CM, Lipsitch M. A modified Janus cassette (Sweet Janus) to improve allelic replacement efficiency by high-stringency negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS One. 2014;9(6):e100510.

Lima FA, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PC, Palma GM, Ferreira JM, Jr., et al. Controlled inflammatory responses in the lungs are associated with protection elicited by a pneumococcal surface protein A-based vaccine against a lethal respiratory challenge with *Streptococcus pneumoniae* in mice. Clinical and Vaccine Immunology : CVI. 2012 Sep;19(9):1382-92

Lima FA, Miyaji EN, Quintilio W, Raw I, Ho PL, Oliveira ML. Pneumococcal Surface Protein A does not affect the immune responses to a combined diphtheria tetanus and pertussis vaccine in mice. Vaccine. 2013 May;31(20):2465-70.

Lu YJ, Gross J, Bogaert D, Finn A, Bagrade L, Zhang Q, et al. Interleukin-17A mediates acquired immunity to pneumococcal colonization. PLoS Pathogens. 2008;4(9):e1000159.

Miyaji EN, Vadesilho CF, Oliveira ML, Zelanis A, Briles DE, Ho PL. Evaluation of a vaccine formulation against *Streptococcus pneumoniae* based on choline-binding proteins. Clin Vaccine Immunol. 2015 Feb;22(2):213-20.

Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, Lynfield R, Lexau C, Bennett NM, et al. Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. Lancet Infect Dis. 2015 Mar;15(3):301-9.

Moreno AT, Oliveira ML, Ferreira DM, Ho PL, Darrieux M, Leite LC, et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and crossprotection. Clin Vaccine Immunol. 2010 Mar;17(3):439-46.

Moreno AT, Oliveira ML, Ho PL, Vadesilho CF, Palma GM, Ferreira JM, Jr., et al. Cross-reactivity of antipneumococcal surface protein C (PspC) antibodies with different strains and evaluation of inhibition of human complement factor H and secretory IgA binding via PspC. Clinical and Vaccine Immunology : CVI. 2012 Apr;19(4):499-507.

Mukerji R, Mirza S, Roche AM, Widener RW, Croney CM, Rhee DK, et al. Pneumococcal surface protein A inhibits complement deposition on the pneumococcal surface by competing with the binding of C-reactive protein to cell-surface phosphocholine. J Immunol. 2012 Dec;189(11):5327-35.

Nahm MH, Lin J, Finkelstein JA, Pelton SI. Increase in the prevalence of the newly discovered pneumococcal serotype 6C in the nasopharynx after introduction of pneumococcal conjugate vaccine. J Infect Dis. 2009 Feb;199(3):320-5.

Novaes HM, Sartori AM, Soárez PC. Hospitalization rates for pneumococcal disease in Brazil, 2004 - 2006. Rev Saude Publica. 2011 Jun;45(3):539-47.

O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. Lancet. 2009 Sep;374(9693):893-902.

Oliveira ML, Miyaji EN, Ferreira DM, Moreno AT, Ferreira PC, Lima FA, et al. Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. PLoS One. 2010;5(5):e10863.

Oma K, Zhao J, Ezoe H, Akeda Y, Koyama S, Ishii KJ, et al. Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice. Vaccine. 2009 May 21;27(24):3181-8

Park IH, Park S, Hollingshead SK, Nahm MH. Genetic basis for the new pneumococcal serotype, 6C. Infect Immun. 2007 Sep;75(9):4482-9.

Pelton SI, Dagan R, Gaines BM, Klugman KP, Laufer D, O'Brien K, et al. Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an interactive symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vaccine. 2003 Apr;21(15):1562-71.

Prymula R, Peeters P, Chrobok V, Kriz P, Novakova E, Kaliskova E, et al. Pneumococcal capsular polysaccharides conjugated to protein D for prevention of acute otitis media caused by both *Streptococcus pneumoniae* and non-typable Haemophilus influenzae: a randomised double-blind efficacy study. Lancet. 2006 Mar;367(9512):740-8.

Prymula R, Schuerman L. 10-valent pneumococcal nontypeable Haemophilus influenzae PD conjugate vaccine: Synflorix. Expert Rev Vaccines. 2009 Nov;8(11):1479-500.

Ren B, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. Infect Immun. 2004 Jan;72(1):114-22.

Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Diekema DJ, Doern GV. Pneumococcal serotypes before and after introduction of conjugate vaccines, United States, 1999-2011(1.). Emerg Infect Dis. 2013 Jul;19(7):1074-83.

Sakai F, Chochua S, Satzke C, Dunne EM, Mulholland K, Klugman KP, et al. Singleplex quantitative assays for the detection and quantification of most pneumococcal serotypes. PLoS One. 2015;10(3):e0121064.

Scott DA, Komjathy SF, Hu BT, Baker S, Supan LA, Monahan CA, et al. Phase 1 trial of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in healthy adults. Vaccine. 2007 Aug;25(33):6164-6.

Shaper M, Hollingshead SK, Benjamin WH, Briles DE. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. Infect Immun. 2004 Sep;72(9):5031-40.

Steel HC, Cockeran R, Anderson R, Feldman C. Overview of community-acquired pneumonia and the role of inflammatory mechanisms in the immunopathogenesis of severe pneumococcal disease. Mediators Inflamm. 2013;2013:490346.

Sung CK, Li H, Claverys JP, Morrison DA. An rpsL cassette, Janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. Appl Environ Microbiol. 2001 Nov;67(11):5190-6.

Swiatlo E, Brooks-Walter A, Briles DE, McDaniel LS. Oligonucleotides identify conserved and variable regions of pspA and pspA-like sequences of *Streptococcus pneumoniae*. Gene. 1997 Apr;188(2):279-84.

Tocheva AS, Jefferies JM, Christodoulides M, Faust SN, Clarke SC. Increase in serotype 6C pneumococcal carriage, United Kingdom. Emerg Infect Dis. 2010 Jan;16(1):154-5.

Trzcinski K, Thompson CM, Srivastava A, Basset A, Malley R, Lipsitch M. Protection against nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* is mediated by antigen-specific CD4+ T cells. Infection and Immunity. 2008 Jun;76(6):2678-84.

Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA, Briles DE, Szalai AJ. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 1999 Sep;67(9):4720-4.

Turner P, Hinds J, Turner C, Jankhot A, Gould K, Bentley SD, et al. Improved detection of nasopharyngeal cocolonization by multiple pneumococcal serotypes by use of latex agglutination or molecular serotyping by microarray. J Clin Microbiol. 2011 May;49(5):1784-9.

Vadesilho CF, Ferreira DM, Moreno AT, Chavez-Olortegui C, Machado de Avila RA, Oliveira ML, et al. Characterization of the antibody response elicited by immunization with pneumococcal surface protein A (PspA) as recombinant protein or DNA vaccine and analysis of protection against an intranasal lethal challenge with *Streptococcus pneumoniae*. Microbial Pathogenesis. 2012 Nov-Dec;53(5-6):243-9

Xin W, Li Y, Mo H, Roland KL, Curtiss R, 3rd. PspA family fusion proteins delivered by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium extend and enhance protection against *Streptococcus pneumoniae*. Infection and Immunity. 2009 Oct;77(10):4518-28

Walker CL, Rudan I, Liu L, Nair H, Theodoratou E, Bhutta ZA, et al. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. Lancet. 2013 Apr;381(9875):1405-16.

Weinberger DM, Malley R, Lipsitch M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. Lancet. 2011 Dec;378(9807):1962-73.

World Health Organization. Estimated Hib and pneumococcal deaths for children under 5 years of age, 2008. World Health Organization; 2012 [atualizado em Dezembro 2013].

World Health Organization, The United Nations Children's Fund. Immunization coverage Fact sheet N^o 378. World Health Organization; 2015 [atualizado em Setembro 2015].

Wyllie AL, Chu ML, Schellens MH, van Engelsdorp Gastelaars J, Jansen MD, van der Ende A, et al. *Streptococcus pneumoniae* in saliva of Dutch primary school children. PloS One. 2014;9(7):e102045.

Yother J, Briles DE. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. J Bacteriol. 1992 Jan;174(2):601-9.

Zhang Z, Clarke TB, Weiser JN. Cellular effectors mediating Th17-dependent clearance of pneumococcal colonization in mice. The Journal of Clinical Investigation. 2009 Jul;119(7):1899-909.