

JÚLIA TAVARES DE CASTRO

***Bordetella pertussis* e seus componentes como sistemas de entrega e adjuvantes  
para o desenvolvimento de vacinas contra *Streptococcus pneumoniae***

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Maria Leonor Sarno de Oliveira

Co-orientadora: Alessandra Soares Schanoski

Versão original

São Paulo

2019

## RESUMO

CASTRO, JT. *Bordetella pertussis* e seus componentes como sistemas de entrega e adjuvantes para o desenvolvimento de vacinas contra *Streptococcus pneumoniae*. 2019. 192f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é uma das principais causas de pneumonia, meningite e sepse. Aproximadamente 400.000 crianças menores de 5 anos morrem anualmente por infecções causadas por pneumococo ao redor do mundo. A proteína A de Superfície de Pneumococo (PspA) é um antígeno bem caracterizado, que confere proteção em modelos animais, representando uma boa alternativa para as vacinas conjugadas atuais. Entretanto, poucos adjuvantes de baixo custo foram propostos até hoje. Em trabalhos anteriores, nosso grupo mostrou que a vacina celular pertussis (wP) é um bom adjuvante quando testada em combinação a PspA, induzindo altos níveis de anticorpos e proteção contra desafios invasivos e de colonização nasal por pneumococo em camundongos. Estes resultados suportam estratégias para o desenvolvimento de vacinas duplas para a proteção contra pertussis e pneumococo. Neste trabalho, duas estratégias para a composição de vacinas duplas foram testadas. Na primeira, o antígeno PspA4Pro (região N-terminal de PspA do clado 4) foi expresso na linhagem vacinal de *B. pertussis*, para a produção de uma vacina recombinante inativada (wP<sup>PspA4Pro</sup>). PspA4Pro foi expresso em fusão com a porção N-terminal da adesina FHA (Hemaglutinina Filamentosa A) de *B. pertussis*, visando o direcionamento para a superfície da bactéria. A expressão foi confirmada por western-blot e diferentes clones foram utilizados para a produção de vacinas wP<sup>PspA4Pro</sup>, através da inativação com formaldeído. A imunização de camundongos BALB/c com diferentes preparações de vacinas wP<sup>PspA4Pro</sup>, em até três doses, induziu baixos níveis de IgG anti-PspA4Pro no soro. Além disso, não foi observada a proteção dos camundongos vacinados após o desafio letal com pneumococo. Desta forma, a vacina recombinante wP<sup>PspA4Pro</sup>, não se mostrou eficaz contra infecções por pneumococo. A segunda estratégia consistiu no uso de um sistema de entrega de antígenos baseado na toxina adenilato ciclase (CyaA) de *B. pertussis*. A CyaA é capaz de se ligar a receptores presentes em células apresentadoras de antígeno, modulando a resposta imune contra antígenos associados. Diferentes fragmentos de PspA dos clados 2 e 4 (F1, F2, F4 e F5), além das regiões N-terminais completas (PspA2Pro e PspA4Pro) foram clonados em uma região permissiva do gene que codifica a CyaA. As proteínas recombinantes foram expressas em *E. coli* e purificadas por métodos cromatográficos. Camundongos BALB/c foram imunizados em

experimentos independentes com as diferentes proteínas CyaA-PspA. As proteínas CyaA-PspA4-F4 e CyaA-PspA4-F5 foram mais imunogênicas induzindo níveis de mais altos de IgG anti-PspA4Pro quando comparadas às proteínas CyaA-PspA4-F1 e CyaA-PspA4-F2. Além disso, 100 % dos camundongos vacinados com a proteína CyaA-PspA4-F5 foram protegidos contra o desafio letal com pneumococo, indicando que este antígeno é um candidato promissor para o desenvolvimento de uma vacina. Assim, as proteínas CyaA-PspA2-F5 e CyaA-PspA4-F5 foram testadas em experimentos adicionais e os resultados mostraram a indução de altos níveis de anticorpos e proteção dos camundongos contra desafios com pneumococo expressando PspAs do clado 2 e 4, respectivamente. A combinação das duas proteínas foi protetora contra os dois desafios, sendo, portanto, uma formulação com potencial de cobertura de isolados mais abrangente. O potencial protetor contra infecções por *B. pertussis* ainda deve ser avaliado.

**Palavras-chave:** *Streptococcus pneumoniae*. PspA. Vacinas. *Bordetella pertussis*. Toxina Adenilato ciclase.

## ABSTRACT

CASTRO, JT. *Bordetella pertussis* and its components as delivery systems and adjuvants for the development of vaccines against *Streptococcus pneumoniae*. 2019. 192f. Thesis (PhD - Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a major cause of pneumonia, meningitis and sepsis. About 400,000 children under the age of 5 die each year from pneumococcal infections worldwide. Pneumococcus Surface Protein A (PspA) is a well-characterized antigen that confers protection in animal models and represents a good alternative to current conjugate vaccines. However, few low-cost adjuvants have been proposed to date. In previous studies, our group has shown that the whole cell pertussis vaccine (wP) is a good adjuvant when tested in combination with PspA, inducing high antibody levels and protection against invasive challenges and pneumococcal nasal colonization in mice. These results support strategies for the development of combined vaccines for protection against pertussis and pneumococcus. In this work, two strategies for the composition of dual vaccines were tested. In the first, the PspA4Pro antigen (N-terminal region of PspA from clade 4) was expressed in the *Bordetella pertussis* vaccine strain for the production of an inactivated recombinant vaccine (wP<sup>PspA4Pro</sup>). PspA4Pro was expressed in fusion with the N-terminal portion of *B. pertussis* FHA (Filamentous hemagglutinin A) adhesin to target the surface of the bacterium. Expression was confirmed by western blot and different clones were used for the production of wP<sup>PspA4Pro</sup> vaccines by inactivation with formaldehyde. Immunization of BALB/c mice with different wP<sup>PspA4Pro</sup> vaccine preparations, at up to three doses, induced low levels of anti-PspA4Pro IgG in the sera. In addition, protection of vaccinated mice against a lethal pneumococcal challenge was not observed. Thus, the wP<sup>PspA4Pro</sup> recombinant vaccine was not effective against pneumococcal infections. The second strategy was to use an antigen delivery system based on *B. pertussis* adenylate cyclase toxin (CyaA). CyaA is capable of binding to receptors present on antigen presenting cells, modulating the immune response against associated antigens. Different PspA fragments from clades 2 and 4 (F1, F2, F4 and F5), as well as complete N-terminal regions (PspA2Pro and PspA4Pro) were cloned into a permissive region of the CyaA gene. Recombinant proteins were expressed in *E. coli* and purified by chromatographic methods. BALB/c mice were immunized in independent experiments with different CyaA-PspA proteins. CyaA-PspA4-F4 and CyaA-PspA4-F5 proteins were more immunogenic, inducing higher levels of anti-PspA4Pro IgG when compared to CyaA-PspA4-F1 and CyaA-

PspA4-F2 proteins. In addition, 100 % of mice vaccinated with the CyaA-PspA4-F5 protein were protected against the lethal pneumococcal challenge, indicating that this antigen is a promising candidate for vaccine development. Thus, the CyaA-PspA2-F5 and CyaA-PspA4-F5 proteins were tested in additional experiments and the results showed the induction of high antibody levels and protection of mice against challenges with pneumococcal strains expressing PspAs from clade 2 and 4, respectively. The combination of the two proteins was protective against both challenges and was therefore a formulation with potential broader coverage of isolates. The protective potential against *B. pertussis* infections has yet to be evaluated.

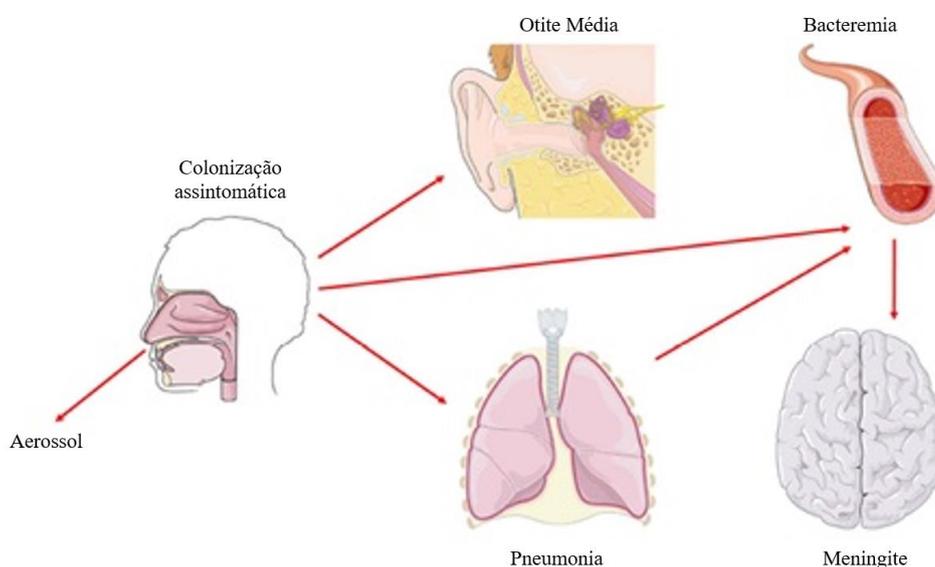
**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*. PspA. Vaccines. *Bordetella pertussis*. Adenylate cyclase toxin.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Streptococcus pneumoniae*

*Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é uma bactéria Gram positiva, em forma de diplococos, anaeróbia facultativa e um importante patógeno humano. É responsável por uma ampla diversidade de doenças, incluindo otite média, pneumonia, meningite e sepse. O pneumococo coloniza o trato respiratório superior de humanos e mantém uma relação comensal e assintomática com o hospedeiro, podendo ocasionalmente invadir sítios estéreis e causar doenças (Weiser, 2010) (Figura 1).

**Figura 1.** - Esquema representativo da transmissão e progressão da infecção por pneumococo.



A bactéria coloniza a nasofaringe e é normalmente assintomática. A transmissão se dá por aerossóis. O pneumococo pode invadir diferentes tecidos e causar diferentes tipos de doenças. (Adaptado de: Loughran, Orihuela and Toumanen; 2019)

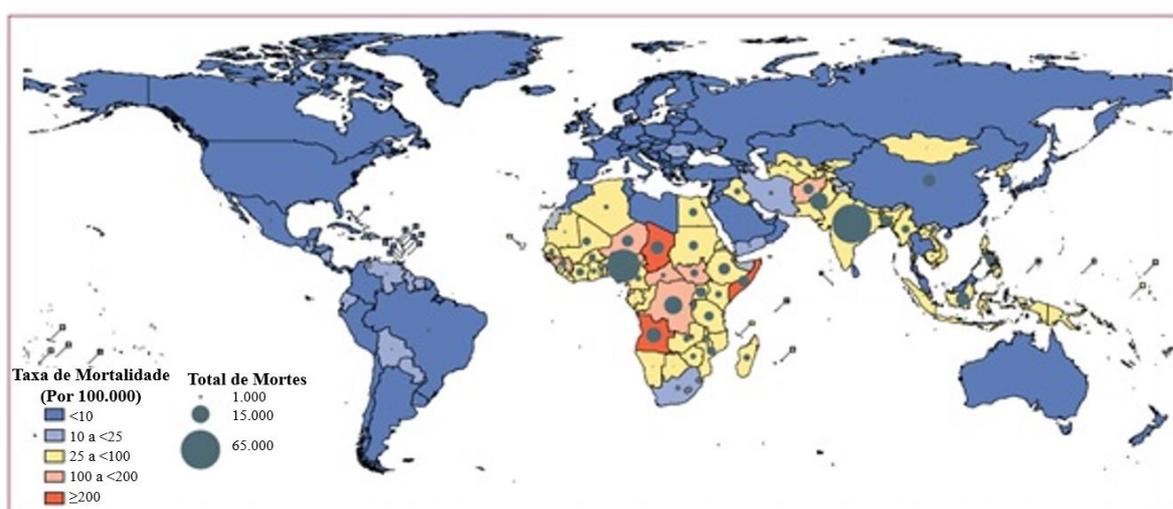
A transmissão do pneumococo se dá entre indivíduos, através de aerossóis de pessoas colonizadas pela bactéria e pela contaminação de objetos com secreções da mucosa nasal. Os índices de colonização variam de 5 a 10 % em adultos saudáveis e de 20 a 40 % em crianças saudáveis (Loughran *et al.*, 2019). Doenças pneumocócicas invasivas são decorrentes da invasão da bactéria a diferentes tecidos, incluindo pulmões, sangue e cérebro. A incidência de doenças pneumocócicas e mortalidade é maior em crianças menores que 5 anos, que não possuem seu sistema imune completamente desenvolvido; idosos, cujo sistema imune está enfraquecido e imunossuprimidos (Cdc, 2012). Em 2017 a Organização Mundial da Saúde classificou o pneumococo como um dos 12 patógenos de importância prioritária.

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência do pneumococo, pois auxilia no escape à fagocitose por células do hospedeiro (Kadioglu *et al.*, 2008). Diferenças na composição química do polissacarídeo que compõe a cápsula são determinantes para a classificação da bactéria em mais de 90 sorotipos. A distribuição dos sorotipos que causam doenças varia de acordo com tempo e idade, tipo e severidade da doença, região geográfica, e presença de genes de resistência antimicrobiana (WHO; 2019).

## 1.2 Epidemiologia

O pneumococo é a principal causa de morbidade e mortalidade por infecções do trato respiratório inferior, sendo responsável por aproximadamente 200 milhões de casos de doenças do trato respiratório inferior e mais de 1 milhão de mortes em 2016, em todo o mundo (Collaborators, 2018). Entre as mortes registradas, 342.000 ocorreram em crianças menores de 5 anos e quase 500.000 em indivíduos maiores de 70 anos (Wahl *et al.*, 2018). O maior número de mortes se dá em países em desenvolvimento. O mapa da Figura 2 mostra a distribuição global dos índices de mortalidade e mortes atribuídas ao pneumococo no ano de 2015. É possível observar que os países com maiores índices de mortalidade encontram-se na região da África e Ásia (Wahl *et al.*, 2018).

**Figura 2.** - Índices de mortalidade e mortes atribuídas às infecções pneumocócicas, em 2015 no mundo.



Mortalidade e morte em crianças de 1 a 59 meses no mundo. Índices de mortalidade = mortes por 100.000 crianças de 1 a 59 meses. (Adaptado de Wahl *et al.*, 2018).

O uso de agentes antimicrobianos está entre as principais estratégias para o tratamento de infecções pneumocócicas. Entretanto, a dificuldade em estabelecer tratamentos eficazes se deve ao surgimento de cepas resistentes a antibióticos, principalmente  $\beta$ -lactâmicos (Kim *et al.*, 2012; Moyo *et al.*, 2012).

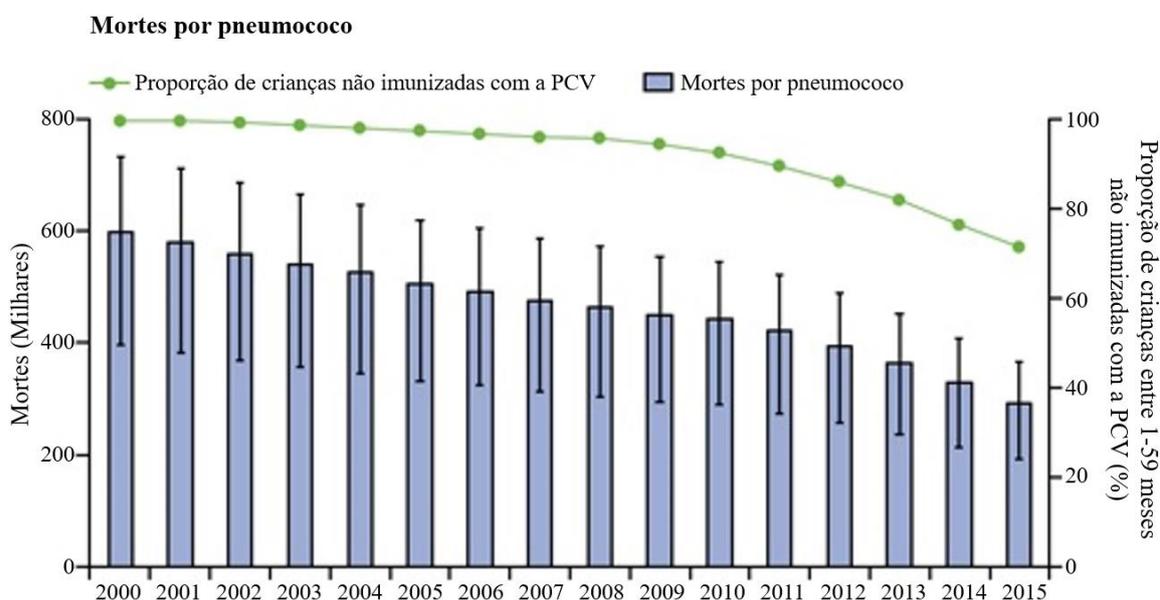
### **1.3 Vacinas disponíveis**

As vacinas de pneumococo comercialmente disponíveis são constituídas por polissacarídeos capsulares (PS). A vacina 23-valente (Pneumovax® 23; Merck), licenciada na década de 70, é composta por polissacarídeos capsulares de 23 sorotipos prevalentes nos Estados Unidos e na Europa. Devido sua composição ser por PS livres, não é capaz de ativar respostas de células T, e, portanto, não induz resposta imune de memória. Sendo assim, esta vacina não é indicada para crianças menores de 2 anos e seu uso em idosos ainda é questionado, devido a falta de evidências de diminuição de doenças invasivas nesta faixa etária (Miyaji *et al.*, 2013). As vacinas de segunda geração são as vacinas de PS conjugados a um carreador proteico. A vacina 7-valente (Prenar®; Wyeth/Pfizer) (PCV7) foi a primeira vacina conjugada, composta por PS de 7 sorotipos de pneumococo (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) mais prevalentes nos Estados Unidos e Europa, conjugados à toxina diftérica destoxificada CRM197. Devido à conjugação com um componente proteico, este tipo de vacina induz resposta dependente de células T, sendo indicada para crianças menores de 2 anos. Com a introdução da PCV7 nos Estados Unidos e Europa, ao redor do ano 2000, houve uma redução das doenças pneumocócicas invasivas e da colonização nasal de crianças por sorotipos de pneumococo contidos na vacina (Whitney *et al.*, 2003; Ghaffar *et al.*, 2004; Gladstone *et al.*, 2011; Weinberger *et al.*, 2011). Entretanto, esta vacina apresenta uma cobertura limitada de sorotipos e alguns estudos realizados demonstraram que após a introdução da vacina PCV7 em alguns países, houve um aumento de doenças causadas por sorotipos não presentes nas vacinas (Hicks *et al.*, 2007; Singleton *et al.*, 2007; Weinberger *et al.*, 2011). Em 2009 e 2010, duas novas vacinas conjugadas foram incorporadas no mercado com um número adicional de sorotipos de pneumococo, ampliando assim a cobertura de isolados. A vacina 10-valente (Synflorix™; GSK) (PCV10) contendo PS de 10 sorotipos e a 13-valente (Prenar 13®; Wyeth/Pfizer) (PVC13) contendo PS de 13 sorotipos foram licenciadas inicialmente na Europa e Estados Unidos. A PCV10 é composta pelos sorotipos 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14 e 23F conjugados com a proteína D do *Haemophilus influenzae*, o sorotipo 18C conjugado

com o toxóide tetânico e o sorotipo 19F conjugado com toxóide diftérico. A PCV13 é composta pelos sorotipos presentes na PCV7 com adicional dos sorotipos 1, 3, 5, 6A, 7F e 19A (Gladstone *et al.*, 2012; Miyaji *et al.*, 2013).

Em 2015, 129 países já tinham introduzido as vacinas PCV em seus calendários de vacinação. Estima-se que de 2000 a 2015 as vacinas tenham evitado 250 mil mortes cumulativas relacionadas a pneumococo, sendo que 95 % delas de 2010 a 2015. O gráfico abaixo representa o número de mortes por pneumococo em crianças de 1 a 59 meses, de 2000 a 2015. É possível observar uma redução no número de mortes com o aumento da cobertura vacinal (Wahl *et al.*, 2018) (Figura 3).

**Figura 3.** - Número de mortes de crianças entre 1 e 59 meses por infecções causadas por pneumococo de 2000 a 2015.

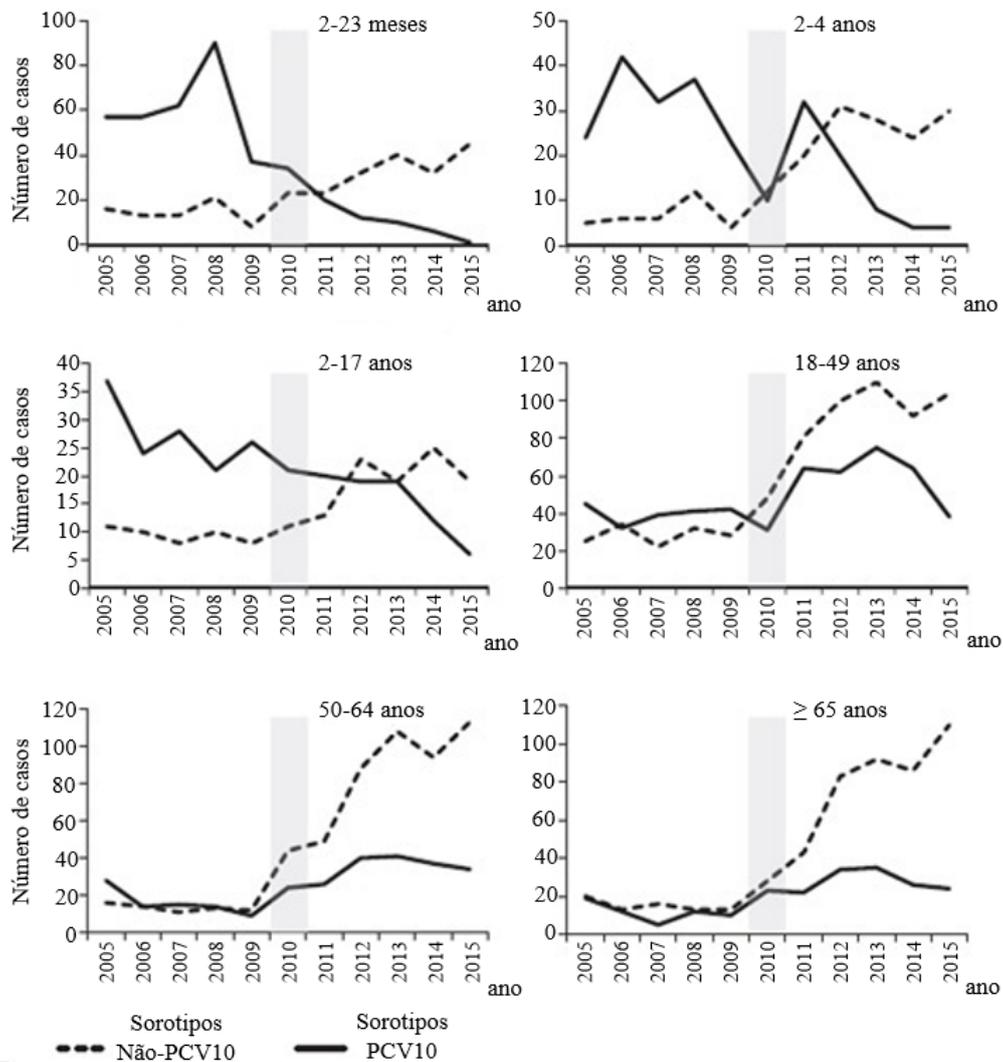


As barras indicam o número de mortes causadas por pneumococo dos anos 2000 a 2015 em crianças de 1 a 59 meses. A linha verde indica a proporção de crianças da mesma faixa etária que não foram imunizadas com a vacina PCV (Adaptado de: Wahl *et al.*, 2018)

Desde março de 2010, a vacina PCV10 compõe o calendário de vacinação brasileiro. A administração para as crianças de até 5 anos de idade é composta por 4 doses, iniciando aos 2, 4 e 6 meses, e um reforço entre 12 e 15 meses. O trabalho de Brandileone e colaboradores mostrou que após a introdução da vacina PCV10 no Brasil, o número de infecções invasivas causadas por sorotipos vacinais diminuiu consideravelmente em crianças de 2 a 23 meses e de 2 a 4 anos. A redução das doenças causadas por sorotipos vacinais também foi observada no grupo etário de 2 a 17 anos, mostrando o efeito rebanho gerado pela vacina PCV10 (Figura 4). Entretanto, em todas

as faixas etárias estudadas, incluindo adultos e idosos, foram observados aumentos nos números de infecção invasiva causadas por sorotipos não vacinais (Figura 4). Entre os principais sorotipos não vacinais observados estão o 19A, 6C e 3. (Brandileone *et al.*, 2018).

**Figura 4.** - Casos de doenças invasivas causadas por pneumococo, por faixa etária e ano, no Brasil.



A barra cinza indica o ano de introdução da vacina PCV10 no Programa Nacional de Imunizações. Linha tracejada representa os sorotipos não vacinais e a linha inteira os sorotipos vacinais (Adaptado de: Brandileone *et al.*; 2018).

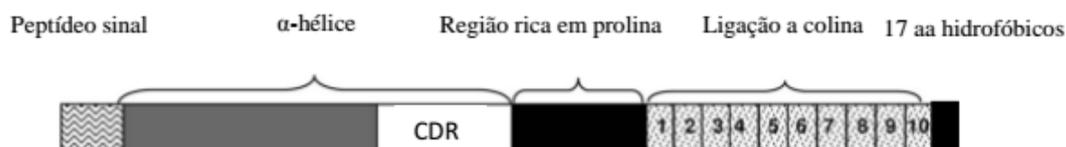
Este estudo mostra a eficácia da PCV10 contra as doenças pneumocócicas invasivas em crianças brasileiras. A continuidade da vigilância epidemiológica é de grande importância para a avaliação da substituição dos sorotipos prevalentes, como ocorre em outros países que adotaram as vacinas conjugadas (Chan *et al.*, 2016; Daniels *et al.*, 2016; Kaur *et al.*, 2016).

Como alternativa às vacinas baseadas em PS, diversos grupos de pesquisa têm estudado formulações compostas por antígenos proteicos para indução de proteção independente dos sorotipos (Miyaji *et al.*, 2013). A Proteína A da superfície do pneumococo (PspA), está entre os antígenos proteicos mais promissores para a composição de uma nova vacina (Tai, 2006; Miyaji *et al.*, 2013).

#### 1.4 Proteína A da superfície do pneumococo (PspA)

A PspA é um importante fator de virulência, expresso em todos os isolados de pneumococo descritos até o momento. PspA influencia na interação bactéria-hospedeiro, impedindo a fixação e deposição da proteína C3 do complemento na superfície da bactéria (Tu *et al.*, 1999; Ren *et al.*, 2004). Além disso, PspA se liga à apolactoferrina presente nas mucosas do hospedeiro, inibindo sua atividade bactericida (Shaper *et al.*, 2004). Sua massa molecular varia de 67 a 99 kDa e a proteína pode ser dividida em cinco domínios: um peptídeo sinal; um domínio  $\alpha$ -hélice altamente carregado; uma região rica em prolina; um domínio de ligação a colina e a região C-terminal (Figura 5) (Hollingshead *et al.*, 2000).

**Figura 5.** - Representação esquemática dos domínios do antígeno PspA de *Streptococcus pneumoniae*.



A proteína é composta por um peptídeo sinal, um domínio  $\alpha$ -hélice seguido de uma região rica em prolina, uma região de ligação a colina e a cauda C-Terminal. CDR = Região definidora de clado (do inglês *Clade defining region*) (Adaptado de: Moreno *et al.*, 2010).

A região de ligação a colina interage com os resíduos de colina presentes na membrana da bactéria, permitindo o ancoramento da PspA. Essa disposição da proteína expõe o domínio de  $\alpha$ -hélice para interação com o sistema imune do hospedeiro. De acordo com as semelhanças entre os aminoácidos presentes na região final da porção N-terminal, denominada região definidora de clado – CDR (Figura 5) - é possível agrupar as PspAs em 6 clados. As PspAs dos clados 1 e 2 pertencem a família 1; PspAs do clado 3, 4 e 5 pertencem a família 2; e PspAs do clado 6 pertencem a família 3 (Hollingshead *et al.*, 2000). Segundo estudos realizados em diversas partes do mundo, a maior parte dos isolados de pneumococo expressam PspAs pertencentes as famílias 1 e 2, sendo que

PspAs da família 3 são raros (Vela Coral *et al.*, 2001; Hollingshead *et al.*, 2006; Pimenta *et al.*, 2011).

Como a reatividade cruzada entre as famílias é baixa, foi proposto que uma vacina baseada em PspA deveria conter ao menos um PspA pertencente à família 1 e outro à família 2 para uma boa cobertura dos isolados. Por outro lado, ao analisar fragmentos de PspA de clados 1 a 5, nosso grupo observou que PspAs de clado 4 (PspA4) e de clado 5 (PspA5) foram capazes de induzir anticorpos que reconhecem PspAs de outras famílias (Darrieux *et al.*, 2008). 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). Estes dados sugerem que PspA4 ou PspA5 são bons candidatos para a formulação de uma vacina com ampla cobertura.

Ao longo dos anos, o nosso grupo tem estudado adjuvantes e diferentes formas de apresentação para vacinas compostas por PspA (Oliveira *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2008; Ferreira, Darrieux, *et al.*, 2009). Os resultados destes estudos e de estudos de outros grupos mostram uma forte correlação entre aumento da proteção em modelos animais e a indução de resposta imune do tipo T-helper 1 (Th1), caracterizada por indução de IgG2a anti-PspA e produção de IFN- $\gamma$  em camundongos (Arulanandam *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2008; Ferreira, Moreno, *et al.*, 2009). Em estudos de vacinas nasais compostas de PspA, nosso grupo também demonstrou uma correlação entre proteção aumentada e secreção de IL-17 por células do pulmão e do baço, após desafio respiratório letal em camundongos (Ferreira, Darrieux, *et al.*, 2009)

### **1.5 Combinação de PspA à vacina celular pertussis (wP)**

A pesquisa em adjuvantes é um elemento crucial no desenvolvimento de vacinas. Adjuvantes são compostos que aumentam a resposta imune específica contra o antígeno coadministrado. Os adjuvantes podem ser utilizados visando aumentar a imunogenicidade de antígenos altamente purificados ou recombinantes, reduzir a quantidade de antígeno ou o número de imunizações necessárias para a imunidade protetora, melhorar a eficácia das vacinas em recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos. Podem também atuar como sistemas de entrega para a absorção de antígeno pela mucosa ou direcionamento às células do sistema imune (Petrovsky e

Aguilar, 2004). Sais de alumínio (Alum) são eficazes em formulações com proteínas recombinantes a serem aplicadas em condições onde respostas Th2 são desejadas. Entretanto, vários grupos têm se concentrado em descrever novos adjuvantes para aplicações onde respostas mediadas por células são mais eficazes (Reed *et al.*, 2009). Tais respostas são geralmente induzidas por vacinas celulares, como o caso da vacina celular pertussis (wP) (Mahon *et al.*, 1996; Berstad, Oftung, *et al.*, 2000; Mcguirk e Mills, 2000; Higgins *et al.*, 2006). Além da alta eficácia de wP contra coqueluche, alguns trabalhos descreveram a sua eficácia como adjuvante, quando administrada em combinação a diferentes antígenos (Berstad, Andersen, *et al.*, 2000; Yano *et al.*, 2007). A vacina celular pertussis (wP) produzida no Instituto Butantan, quando usada como adjuvante em combinação à proteína PspA recombinante, apresentou resultados promissores em modelos animais. A imunização com PspA-wP foi capaz de proteger camundongos contra desafios letais respiratórios e também contra desafios de colonização por pneumococo (Oliveira *et al.*, 2010). A resposta imune protetora foi caracterizada principalmente pela indução de altos níveis de anticorpos anti-PspA. Além disso, camundongos vacinados com PspA-wP apresentaram, após o desafio com pneumococo, uma resposta inflamatória, que foi controlada rapidamente, levando à eliminação da bactéria, sem causar danos excessivos aos tecidos (Lima *et al.*, 2012). A imunização nasal de camundongos com PspAs recombinantes combinados à vacina wP foi também protetora contra um desafio de co-colonização, no qual duas cepas de pneumococo expressando PspAs heterólogos foram inoculadas concomitantemente. Estes resultados sugerem que formulações compostas por PspAs das famílias 1 e 2 combinados a wP podem induzir proteção abrangente de isolados (Tostes *et al.*, 2017).

Através de uma colaboração com o grupo coordenado pela Dr<sup>a</sup> Nathalie Mielcarek e pelo Dr. Camille Lochet do Instituto Pasteur, Lille, França, foi possível a caracterização dos componentes de *B. pertussis* determinantes para a atividade adjuvante observada. Os resultados demonstraram que a toxina pertussis é responsável, pelo menos em parte, pelo efeito adjuvante da wP em combinação a PspA (Salcedo-Rivillas *et al.*, 2014). A vacina wP é um dos componentes da vacina tríplice DTwP (difteria, tétano, pertussis) produzida pelo Instituto Butantan e administrada em crianças brasileiras aos 2, 4 e 6 meses, com reforços aos 18 meses e 5 anos de idade. A DTwP se mostrou tão eficaz quanto a wP como adjuvante em combinação a PspA. A formulação PspA-DTwP, administrada por via subcutânea em camundongos, foi capaz de induzir altos níveis de

anticorpos anti-PspA e proteção contra infecção invasiva com diferentes linhagens de pneumococo. Além disso, a presença de PspA na formulação não interferiu na resposta imune contra os três componentes da vacina DTwP (Lima *et al.*, 2013). Juntos, estes dados demonstram que a composição de uma vacina quádrupla através da inclusão de PspA na vacina DTwP é uma estratégia interessante, que pode resultar em proteção adicional contra pneumococo, aproveitando a atividade adjuvante da wP e o calendário de imunização nacional.

### **1.6 *Bordetella pertussis* e seus fatores de virulência**

*Bordetella pertussis* é uma bactéria gram-negativa, aeróbica, em forma de coccobacilo, e agente causador da coqueluche, uma infecção severa do trato respiratório, que afeta principalmente crianças recém-nascidas (Higgs *et al.*, 2012). A *B. pertussis* expressa uma variedade de fatores de virulência, dentre eles a toxina pertussis (PT), toxina dermonecrótica (DNT), fimbrias (Fim), pertactina (Prn) toxina adenilato ciclase (CyaA) e Hemaglutinina Filamentosa (FHA) (Melvin *et al.*, 2014). A vacina celular (wP), já descrita anteriormente, é a vacina de primeira geração, composta pela bactéria inteira inativada por tratamento com formaldeído. Devido a diferenças nas linhagens vacinais e nos protocolos de produção das vacinas celulares, variabilidade na eficácia contra coqueluche e nos efeitos adversos causados após a vacinação de crianças foram relatados no mundo todo. Esses fatores levaram ao desenvolvimento de vacinas acelulares, compostas por antígenos purificados, que foram adotadas por alguns países como Japão, Estados Unidos e países da Europa (revisado por (Locht, 2016)) As formulações acelulares também variam em composição, sendo que PT e FHA estão sempre presentes, mas algumas formulações também contêm pertactina e fimbrias. Nos últimos anos, diversas partes do mundo têm enfrentado um aumento nos casos de coqueluche e de mortes de bebês por esta doença (Masseria *et al.*, 2017; Muloiwa *et al.*, 2018). Entre os fatores que contribuíram para este aumento estão escapes das cepas circulantes devido a pressão das vacinas, diminuição da imunidade conferida pelas vacinas após alguns anos e falha na proteção contra colonização nasal (Van Der Ark *et al.*, 2012; Allen, 2013). Vários estudos mostram que as formulações acelulares disponíveis são piores que as vacinas celulares para a proteção contra colonização e, dessa forma, não impedem a transmissão (Smallridge *et al.*, 2014; Warfel *et al.*, 2014); Sendo assim, adolescentes e adultos que apresentam sintomas leves ou são assintomáticos servem de reservatório, podendo transmitir a crianças que ainda não

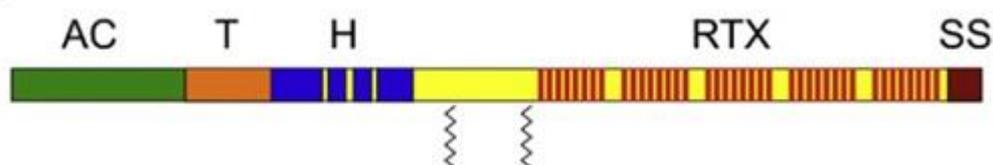
receberam o regime completo de vacinação (Mahmud *et al.*, 2019). Atualmente, a recomendação da Organização Mundial de Saúde e do grupo *Global Pertussis Initiative* é para que os países que ainda utilizam as vacinas wP, como o Brasil, não adotem a vacina acelular para crianças (WHO | Pertussis vaccines position paper, 2015; Forsyth *et al.*, 2018). Outra medida é a vacinação de grávidas com vacinas acelulares visando a transferência de anticorpos para os recém-nascidos e proteção contra a doença antes de completar o regime de vacinação infantil (WHO | Pertussis vaccines position paper, 2015; Forsyth *et al.*, 2018). Entretanto, para resolver este problema, diversos grupos de pesquisa têm proposto modificações nas vacinas acelulares, como a inclusão de adjuvantes (Allen *et al.*, 2018) ou de antígenos como a CyaA (Boehm *et al.*, 2018), de forma a modular a resposta imune e aumentar a eficácia contra a colonização nasal pela bactéria. Entre as propostas, a BPZE1, uma vacina viva atenuada, tem se mostrado bastante promissora e está atualmente sendo testada em ensaios de fase clínica II (Thorstensson *et al.*, 2014; Loch *et al.*, 2017).

O FHA é uma grande proteína associada superfície da bactéria, de aproximadamente 220kDa, em forma de bastonete, que contém 3 domínios diferentes: um domínio de ligação a carboidratos, um domínio de ligação a glicosaminoglicanos e um domínio RGD (arginina-glicina-aspartato) que está envolvido na ligação a receptores tipo integrina presentes nos leucócitos (Melvin *et al.*, 2014). Sua principal função é mediar a adesão da bactéria às células ciliadas epiteliais. O FHA atua também na persistência da infecção e pode, direta ou indiretamente modular o sistema imune do hospedeiro. Trata-se da adesina mais abundante de *B. pertussis* (Smith *et al.*, 2001; Higgs *et al.*, 2012). FHA apresenta atividade adjuvante, sendo capaz de aumentar a produção de anticorpos contra antígenos associados por via oral, nasal ou subcutânea (Poulain-Godefroy *et al.*, 2003; Salcedo-Rivillas *et al.*, 2014). Apesar dos mecanismos desta atividade adjuvante não serem completamente conhecidos, Dirix e colaboradores mostraram que o FHA ou um fragmento correspondente à região N-Terminal da proteína (Fha44) são capazes de induzir a maturação de células dendríticas derivadas de monócitos humanos, além de estimular a secreção de IL-12, IL-6 e IL-23 *in vitro* (Dirix *et al.*, 2014).

A CyaA é um fator de virulência da bactéria capaz de induzir resposta imune protetora em modelos animais de pertussis. Esta toxina não está presente nas formulações de vacina pertussis acelulares disponíveis atualmente no mercado, apesar

de muitos grupos defenderem a sua inclusão (Carbonetti, 2010). A CyaA é uma proteína com 1706 resíduos de aminoácidos, apresentando um domínio AC, responsável pela catálise da síntese de cAMP a partir de ATP no interior da célula, e uma região C-Terminal RTX (*Repeat-in-toxin*) envolvida da ligação e internalização da toxina nas células hospedeiras alvo (Figura 6).

**Figura 6.** - Representação esquemática da Toxina Adenilato Cilase (CyaA) de *Bordetella pertussis*.



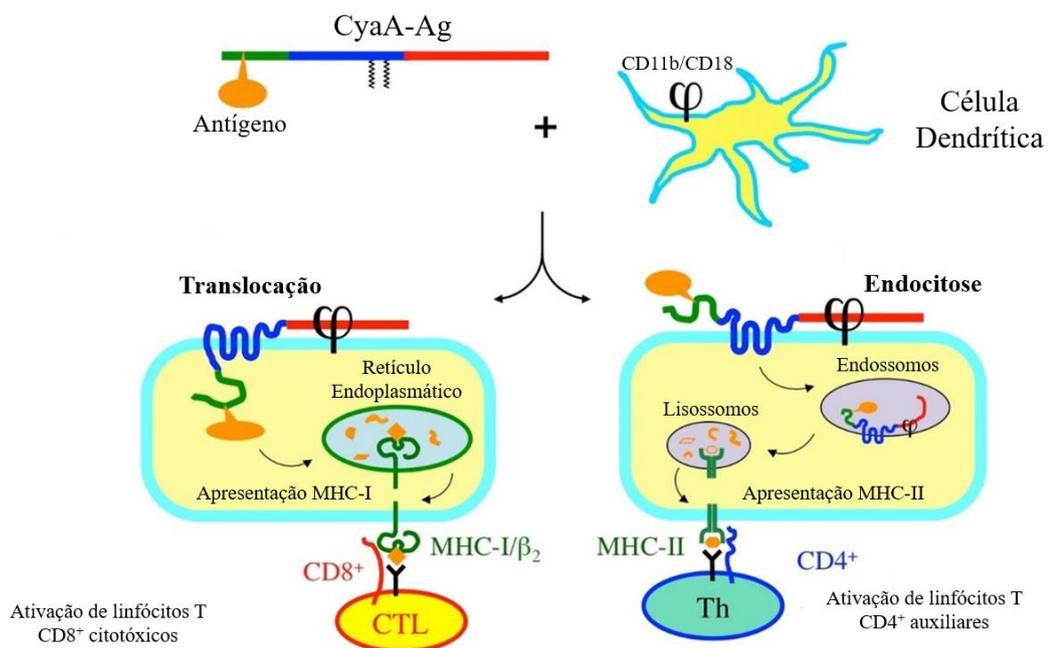
AC = Domínio catalítico; T = Domínio de translocação; H = Seguintes hidrofóbicos; RTX = Domínio *Repeat-in-Toxin*; SS = Sinal de secreção. (Adaptado de: (Chenal *et al.*, 2015).

A CyaA liga-se principalmente ao receptor CD11b/CD18 (também conhecido como CR3 ou Mac-1) expresso por células apresentadoras de antígeno como macrófagos e células dendríticas. Após a ligação, o domínio AC é internalizado no citosol celular, onde é ativado pela calmodulina para produzir quantidades supra fisiológicas de cAMP que alteram o funcionamento das células alvo. Além disso, a CyaA apresenta a capacidade de formar pequenos poros na superfície das células pelos quais pode ser internalizada, apesar deste mecanismo ser menos eficiente que a ligação através do receptor (Masin *et al.*, 2015).

Com base nestas propriedades da CyaA, o grupo do Dr. Daniel Ladant do Instituto Pasteur de Paris, desenvolveu um sistema de entrega de antígenos vacinais. Este sistema funciona através da clonagem de peptídeos em uma região permissiva do domínio catalítico (AC) da CyaA (Gmira *et al.*, 2001). Além disso, a atividade de citotóxica foi abolida através de uma mutação em um dipeptídeo essencial para a atividade catalítica da adenilato ciclase (Mascarell *et al.*, 2006). Como resultado, este sistema é capaz de direcionar antígenos heterólogos às células apresentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas, modulando a resposta imune, mesmo na ausência de adjuvantes (Figura 7). Este sistema é capaz de comportar peptídeos de

diferentes tamanhos e já foi utilizado de forma eficiente para a indução de anticorpos e células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> específicas contra os antígenos de HIV e HPV.

**Figura 7.** - Representação esquemática da interação de CyaA com as células apresentadoras de antígenos .



A CyaA recombinante carregando um antígeno inserido no domínio catalítico, CyaA-Ag, se liga às células dendríticas (DC) através de interação seletiva com o receptor CD11b/CD18 ( $\phi$ ). Após a translocação, através da membrana plasmática da DC (esquerda); o antígeno é degradado pelo proteossoma em peptídeos que podem alcançar a via de apresentação de MHC classe I, para induzir respostas específicas de células T CD8<sup>+</sup>. Alternativamente, a CyaA recombinante, após a ligação ao receptor, pode ser endocitada (direita). Após a proteólise em endossomos/lisossomos, os peptídeos libertados, podem entrar na via de apresentação de MHC de classe II, para induzir respostas de células T CD4<sup>+</sup>. Adaptado de: (Chenal e Ladant, 2018).

Neste trabalho, as propriedades adjuvantes de *B. pertussis* foram aplicadas em duas estratégias para o desenvolvimento de vacinas contra pneumococo, baseadas no antígeno PspA.

A primeira estratégia consistiu na expressão do antígeno PspA do clado 4 contendo o primeiro bloco da região rica em prolinas (PspA4Pro) na linhagem vacinal de *B. pertussis* do Instituto Butantan, para a produção de uma vacina recombinante inativada (wP<sup>PspA4Pro</sup>). Esta proposta foi baseada nos trabalhos anteriores do grupo que mostraram que a combinação da vacina wP a PspA é capaz de proteger camundongos contra desafios letais e de colonização por pneumococo (Oliveira *et al.*, 2010; Tostes *et al.*, 2017) . A vantagem da expressão de PspA4Pro na linhagem vacinal de pertussis seria a produção da vacina dupla pertussis-pneumococo através de um único cultivo, eliminando as etapas de expressão e purificação de PspA recombinante em *E. coli*.

A segunda estratégia consistiu em testar o sistema de apresentação de antígenos CyaA para a apresentação de PspA. A capacidade da CyaA de induzir resposta Th1 em camundongos com produção de anticorpos e de IFN- $\gamma$  contra antígenos co-expressos (Prévaille *et al.*, 2005), indica que este sistema pode ser capaz de induzir resposta protetora contra PspA.

As vacinas derivadas de ambas as estratégias foram testadas quanto a capacidade de induzir resposta imune e proteção contra desafios com pneumococo em camundongos.

## 6 CONCLUSÕES

- O processo de conjugação realizado com a finalidade de obter clones recombinantes de *Bordetella pertussis* foi eficiente sendo que diferentes clones expressando a proteína PspA4Pro em fusão com Fha44 foram obtidos. Entretanto, a recombinação da sequência de interesse no genoma da bactéria não ocorreu conforme o esperado, e, apesar dos clones expressarem a proteína Fha44:PspA4Pro, não obtivemos resultado claro sobre a inserção da sequência de interesse no genoma da bactéria.
- Nas condições testadas, as vacinas wP<sup>PspA4Pro</sup> não induziram ou induziram níveis muito baixos de IgG anti-PspA4Pro e não foram capazes de proteger contra o desafio letal com pneumococo.
- O sistema de apresentação de antígenos baseado na CyaA foi adequado para expressão dos fragmentos de PspA, sendo, inclusive viável a expressão de fragmentos grandes, como o PspA2Pro e o PspA4Pro.
- As proteínas CyaA-PspA2Pro, CyaA-PspA4Pro, CyaA-PspA2-F5 e CyaA-PspA4-F5, parecem ser bons candidatos vacinais contra o pneumococo, uma vez que foram capazes de gerar níveis significativos de IgG específicos contra PspA2Pro e PspA4Pro e, em combinação, foram capazes de proteger os animais contra desafios realizados com as bactérias A66.1 e 3JYP2670 que expressam, respectivamente, PspA2 e PspA4.
- Os anticorpos gerados contra as proteínas CyaA-PspA2Pro, CyaA-PspA4Pro, CyaA-PspA2-F5 e CyaA-PspA4-F5 foram capazes de se ligar eficientemente à superfície das bactérias, comprovando o reconhecimento das PspAs nativas. Além disto a proteína CyaA-PspA4-F5 foi capaz de proteger, os animais também contra o desafio letal com a cepa ATCC6303, que expressa PspA5.
- A atividade adjuvante de CyaA foi comprovada para as proteínas CyaA-PspA2-F5 e CyaA-PspA4-F5.
- As proteínas CyaA-PspA são capazes de induzir anticorpos específicos contra proteínas de *B. pertussis*. A proteção contra este patógeno ainda deve ser testada.

## REFERÊNCIAS

AIDA, Y.; PABST, M. J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. **J Immunol Methods**, v. 132, n. 2, p. 191-5, Sep 1990. ISSN 0022-1759. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2170533> >.

ALLEN, A. Public health. The pertussis paradox. **Science**, v. 341, n. 6145, p. 454-5, Aug 2013. ISSN 1095-9203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23908204> >.

ALLEN, A. C. et al. Sustained protective immunity against *Bordetella pertussis* nasal colonization by intranasal immunization with a vaccine-adjuvant combination that induces IL-17-secreting TRM cells. **Mucosal Immunol**, v. 11, n. 6, p. 1763-1776, Nov 2018. ISSN 1933-0219. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/s41385-018-0080-x> >.

ARULANANDAM, B. P. et al. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A and interleukin-12 augments antibody-mediated opsonization and protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infect Immun**, v. 69, n. 11, p. 6718-24, Nov 2001. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11598043> >.

BERSTAD, A. K. et al. Inactivated meningococci and pertussis bacteria are immunogenic and act as mucosal adjuvants for a nasal inactivated influenza virus vaccine. **Vaccine**, v. 18, n. 18, p. 1910-9, Mar 2000. ISSN 0264-410X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10699340> >.

BERSTAD, A. K. et al. Induction of antigen-specific T cell responses in human volunteers after intranasal immunization with a whole-cell pertussis vaccine. **Vaccine**, v. 18, n. 22, p. 2323-30, May 2000. ISSN 0264-410X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10738087> >.

BOEHM, D. T. et al. Evaluation of Adenylate Cyclase Toxoid Antigen in Acellular Pertussis Vaccines by Using a *Bordetella pertussis* Challenge Model in Mice. **Infect Immun**, v. 86, n. 10, Oct 2018. ISSN 0019-9567. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.00857-17> >.

BRANDILEONE, M. C. et al. Distribution of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes before and 5 years after the introduction of 10-valent pneumococcal conjugate vaccine in Brazil. **Vaccine**, v. 36, n. 19, p. 2559-2566, 05 2018. ISSN 1873-2518. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29650385> >.

BRITO, L. A.; SINGH, M. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 1, p. 34-7, Jan 2011. ISSN 0022-3549. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1002/jps.22267> >.

CAMPOS, I. B. 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 Infect**, v. 10, n. 5, p. 481-8, Apr 2008. ISSN 1286-4579. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403234> >.

CARBONETTI, N. H. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. **Future Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 455-69, Mar 2010. ISSN 1746-0921. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20210554> >.

CDC. **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases**. W, A.;S, W., et al: Washington DC: Public Health Foundation. 12th ed 2012.

CHAN, K. C. et al. Pneumococcal carriage in young children after introduction of PCV13 in Hong Kong. **Vaccine**, v. 34, n. 33, p. 3867-74, 07 2016. ISSN 1873-2518. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27265449> >.

CHENAL, A.; LADANT, D. Bioengineering of *Bordetella pertussis* Adenylate Cyclase Toxin for Antigen-Delivery and Immunotherapy. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 7, Jul 20 2018. ISSN 2072-6651. Available at: < <http://dx.doi.org/10.3390/toxins10070302> >.

CHENAL, A. et al. Structure and function of RTX toxins. In: (Ed.). **The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins**. FOURTH: ELSEVIER, 2015. chap. Structure and function of RTX toxins,

COLLABORATORS, G. L. R. I. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet Infect Dis**, v. 18, n. 11, p. 1191-1210, 11 2018. ISSN 1474-4457. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30243584> >.

COPPENS, I. et al. Production of *Neisseria meningitidis* transferrin-binding protein B by recombinant *Bordetella pertussis*. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5440-6, Sep 2001. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.69.9.5440-5446.2001> >.

DANIELS, C. C.; ROGERS, P. D.; SHELTON, C. M. A Review of Pneumococcal Vaccines: Current Polysaccharide Vaccine Recommendations and Future Protein Antigens. **J Pediatr Pharmacol Ther**, v. 21, n. 1, p. 27-35, 2016 Jan-Feb 2016. ISSN 1551-6776. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26997927> >.

DARRIEUX, M. et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 3, p. 273-8, Mar 2008. ISSN 0022-2615 (Linking). Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18287288](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18287288) >.

DIRIX, V. et al. Human dendritic cell maturation and cytokine secretion upon stimulation with Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin. **Microbes Infect**, v. 16, n. 7, p. 562-70, Jul 2014. ISSN 1769-714X (Electronic) 1286-4579 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24801497> >.

FERREIRA, D. M. et al. Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein a is characterized by a balanced immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 3, p. 499-505, Mar 2008. ISSN 1556-679X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18184825> >.

FERREIRA, D. M. 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. **Clin Vaccine Immunol**, v. 16, n. 5, p. 636-45, May 2009. ISSN 1556-679X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279169> >.

FERREIRA, D. M. et al. DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 4, p. 375-8, Apr 2006. Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16533983](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16533983) >.

FERREIRA, D. M. et al. Comparison of the pulmonary response against lethal and non-lethal intranasal challenges with two different pneumococcal strains. **Microb Pathog**, v. 47, n. 3, p. 157-63, Sep 2009. ISSN 1096-1208. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467320> >.

FERREIRA, D. M. et al. Protection against nasal colonization with Streptococcus pneumoniae by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). **Microb Pathog**, v. 48, n. 6, p. 205-13, Jun 2010. ISSN 1096-1208. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20206678> >.

FIGUEIREDO, D. B. et al. Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 101, n. 6, p. 2305-2317, Mar 2017. ISSN 1432-0614. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27889801> >.

FORSYTH, K. D. et al. Recommendations to control pertussis prioritized relative to economies: A Global Pertussis Initiative update. **Vaccine**, v. 36, n. 48, p. 7270-7275, Nov 19 2018. ISSN 0264-410x. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.10.028> >.

FOWLER, S. et al. Modifications of the catalytic and binding subunits of pertussis toxin by formaldehyde: effects on toxicity and immunogenicity. **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2329-37, Jun 2 2003. ISSN 0264-410X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12744863> >.

GENTICEL. Phase II Study of HPV Therapeutic Vaccine in HPV Infected Women With Normal Cytology or ASCUS/LSIL (RHEIA-VAC). 2013. Available at: < <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01957878> >. Accessed on: 02/09/2019.

GHAFFAR, F. et al. Effect of the 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae* in the first 2 years of life. **Clin Infect Dis**, v. 39, n. 7, p. 930-8, Oct 2004. ISSN 1537-6591. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472842> >.

GLADSTONE, R. A. et al. Continued control of pneumococcal disease in the UK - the impact of vaccination. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 1, p. 1-8, Jan 2011. ISSN 1473-5644. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20965923> >.

GLADSTONE, R. A. et al. Pneumococcal 13-valent conjugate vaccine for the prevention of invasive pneumococcal disease in children and adults. **Expert Rev Vaccines**, v. 11, n. 8, p. 889-902, Aug 2012. ISSN 1744-8395. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002969> >.

GMIRA, S.; KARIMOVA, G.; LADANT, D. Characterization of recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxins carrying passenger proteins. **Res Microbiol**, v. 152, n. 10, p. 889-900, Dec 2001. ISSN 0923-2508. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11766964> >.

GUERMONPREZ, P. et al. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: a vehicle to deliver CD8-positive T-cell epitopes into antigen-presenting cells. **Methods Enzymol**, v. 326, p. 527-42, 2000. ISSN 0076-6879. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11036662> >.

GUERMONPREZ, P. et al. The Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis* Binds to Target Cells via the  $\alpha M\beta 2$  Integrin (Cd11b/Cd18). In: (Ed.). **J Exp Med**, v.193, 2001. p.1035-44. ISBN 0022-1007 (Print)1540-9538 (Electronic).

HANNIFFY, S. B. et al. Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. **J Infect Dis**, v. 195,

n. 2, p. 185-93, Jan 2007. ISSN 0022-1899. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17191163> >.

HICKS, L. A. 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**, v. 196, n. 9, p. 1346-54, Nov 2007. ISSN 0022-1899. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17922399> >.

HIGGINS, S. C. et al. TLR4 mediates vaccine-induced protective cellular immunity to Bordetella pertussis: role of IL-17-producing T cells. **J Immunol**, v. 177, n. 11, p. 7980-9, Dec 2006. ISSN 0022-1767. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114471> >.

HIGGS, R. et al. Immunity to the respiratory pathogen Bordetella pertussis. **Mucosal Immunol**, v. 5, n. 5, p. 485-500, Sep 2012. ISSN 1933-0219. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2012.54> >.

HOLLINGSHEAD, S. K. et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 2, p. 215-21, Feb 2006. ISSN 0022-2615. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16434715> >.

HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in Streptococcus pneumoniae. **Infect Immun**, v. 68, n. 10, p. 5889-900, Oct 2000. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10992499> >.

KADIOGLU, A. et al. The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 4, p. 288-301, Apr 2008. ISSN 1740-1534. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18340341> >.

KAMMOUN, H. et al. Immunogenicity of live attenuated B. pertussis BPZE1 producing the universal influenza vaccine candidate M2e. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59198, 2013. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23555631> >.

KAUR, R.; CASEY, J. R.; PICHICHERO, M. E. Emerging Streptococcus pneumoniae Strains Colonizing the Nasopharynx in Children After 13-valent Pneumococcal Conjugate Vaccination in Comparison to the 7-valent Era, 2006-2015. **Pediatr Infect Dis J**, v. 35, n. 8, p. 901-6, 08 2016. ISSN 1532-0987. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27420806> >.

KHELEF, N.; GOUNON, P.; GUIISO, N. Internalization of Bordetella pertussis adenylate cyclase-haemolysin into endocytic vesicles contributes to macrophage

cytotoxicity. **Cell Microbiol**, v. 3, n. 11, p. 721-30, Nov 2001. ISSN 1462-5814. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696032> >.

KIM, S. 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 3, p. 1418-26, Mar 2012. ISSN 1098-6596. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232285> >.

LI, R.; LIM, A.; ALONSO, S. Attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 as a live vehicle for heterologous vaccine antigens delivery through the nasal route. **Bioeng Bugs**, v. 2, n. 6, p. 315-9, 2011 Nov-Dec 2011. ISSN 1949-1026. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22067832> >.

LIMA, F. A. 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. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 9, p. 1382-92, Sep 2012. ISSN 1556-679X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22761301> >.

LIMA, F. A. et al. Pneumococcal Surface Protein A does not affect the immune responses to a combined diphtheria tetanus and pertussis vaccine in mice. **Vaccine**, v. 31, n. 20, p. 2465-70, May 2013. ISSN 1873-2518. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23541622> >.

LOCHT, C. Pertussis: acellular, whole-cell, new vaccines, what to choose? **Expert Rev Vaccines**, v. 15, n. 6, p. 671-3, 06 2016. ISSN 1744-8395. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26938372> >.

LOCHT, C. et al. Live Attenuated Pertussis Vaccine BPZE1 Protects Baboons Against *Bordetella pertussis* Disease and Infection. **J Infect Dis**, v. 216, n. 1, p. 117-124, Jul 1 2017. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix254> >.

LOUCKA, J. et al. Delivery of a MalE CD4(+)-T-cell epitope into the major histocompatibility complex class II antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. **Infect Immun**, v. 70, n. 2, p. 1002-5, Feb 2002. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

LOUGHRAN, A. J.; ORIHUELA, C. J.; TUOMANEN, E. I.: Invasion and Inflammation. **Microbiol Spectr**, v. 7, n. 2, 03 2019. ISSN 2165-0497. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30873934> >.

MAHMUD, A. S.; LIPSITCH, M.; GOLDSTEIN, E. On the role of different age groups during pertussis epidemics in California, 2010 and 2014. **Epidemiol Infect**, v. 147, p. e184, Jan 2019. ISSN 0950-2688. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268819000761> >.

MAHON, B. P. et al. Interleukin-12 is produced by macrophages in response to live or killed *Bordetella pertussis* and enhances the efficacy of an acellular pertussis vaccine by promoting induction of Th1 cells. **Infect Immun**, v. 64, n. 12, p. 5295-301, Dec 1996. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8945580> >.

MASCARELL, L. et al. Delivery of the HIV-1 Tat protein to dendritic cells by the CyaA vector induces specific Th1 responses and high affinity neutralizing antibodies in non human primates. **Vaccine**, v. 24, n. 17, p. 3490-9, Apr 2006. ISSN 0264-410X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524647> >.

MASCARELL, L. et al. Induction of neutralizing antibodies and Th1-polarized and CD4-independent CD8+ T-cell responses following delivery of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. **J Virol**, v. 79, n. 15, p. 9872-84, Aug 2005. ISSN 0022-538X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16014948> >.

MASIN, J. et al. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a unique combination of a pore-forming moiety with a cell-invading adenylate cyclase enzyme. **Pathog Dis**, v. 73, n. 8, p. ftv075, Nov 2015. ISSN 2049-632X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26391732> >.

MASSERIA, C. et al. Incidence and Burden of Pertussis Among Infants Less Than 1 Year of Age. **Pediatr Infect Dis J**, v. 36, n. 3, p. e54-e61, 03 2017. ISSN 1532-0987. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27902648> >.

MCGUIRK, P.; MILLS, K. H. A regulatory role for interleukin 4 in differential inflammatory responses in the lung following infection of mice primed with Th1- or Th2-inducing pertussis vaccines. **Infect Immun**, v. 68, n. 3, p. 1383-90, Mar 2000. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10678951> >.

MELVIN, J. A. et al. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. **Nat Rev Microbiol**, v. 12, n. 4, p. 274-88, Apr 2014. ISSN 1740-1534. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24608338> >.

MIELCAREK, N. et al. Intranasal priming with recombinant *Bordetella pertussis* for the induction of a systemic immune response against a heterologous antigen. **Infect Immun**, v. 65, n. 2, p. 544-50, Feb 1997. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

MIYAJI, E. N. et al. Serotype-independent pneumococcal vaccines. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 18, p. 3303-26, Sep 2013. ISSN 1420-9071. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269437> >.

MORENO, A. T. et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clin Vaccine Immunol**, Jan 20 2010. ISSN 1556-679X. Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20089795](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20089795) >.

MOYO, S. J. et al. Penicillin resistance and serotype distribution of Streptococcus pneumoniae in nasopharyngeal carrier children under 5 years of age in Dar es Salaam, Tanzania. **J Med Microbiol**, v. 61, n. Pt 7, p. 952-9, Jul 2012. ISSN 1473-5644. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22442292> >.

MULOIWA, R. et al. Pertussis in Africa: Findings and recommendations of the Global Pertussis Initiative (GPI). **Vaccine**, v. 36, n. 18, p. 2385-2393, 04 2018. ISSN 1873-2518. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29602703> >.

OH, H. et al. Characterization of the carbohydrate binding and ADP-ribosyltransferase activities of chemically detoxified pertussis toxins. **Vaccine**, v. 31, n. 29, p. 2988-93, Jun 24 2013. ISSN 1873-2518 (Electronic) 0264-410X (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23664992> >.

OLIVEIRA, M. L. et al. Induction of systemic and mucosal immune response and decrease in Streptococcus pneumoniae colonization by nasal inoculation of mice with recombinant lactic acid bacteria expressing pneumococcal surface antigen A. **Microbes Infect**, v. 8, n. 4, p. 1016-24, Apr 2006. ISSN 1286-4579. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549380> >.

OLIVEIRA, M. L. et al. Combination of pneumococcal surface protein A (PspA) with whole cell pertussis vaccine increases protection against pneumococcal challenge in mice. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10863, 2010. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20523738> >.

PETROVSKY, N.; AGUILAR, J. C. Vaccine adjuvants: current state and future trends. **Immunol Cell Biol**, v. 82, n. 5, p. 488-96, Oct 2004. ISSN 0818-9641. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479434> >.

PIMENTA, F. C. et al. Serotype and genotype distributions of pneumococcal carriage isolates recovered from Brazilian children attending day-care centres. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 10, p. 1455-9, Oct 2011. ISSN 1473-5644. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21636673> >.

POULAIN-GODEFROY, O. et al. Adjuvant activity of free Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin delivered by mucosal routes. **Scand J Immunol**, v. 58, n. 5, p. 503-10, Nov 2003. ISSN 0300-9475. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14629622> >.

PRÉVILLE, X. et al. Eradication of established tumors by vaccination with recombinant Bordetella pertussis adenylate cyclase carrying the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. **Cancer Res**, v. 65, n. 2, p. 641-9, Jan 2005. ISSN 0008-5472. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15695409> >.

RAMOS, C. R. et al. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 8, p. 1103-9, Aug 2004. Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15273812](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15273812) >.

REED, S. G. et al. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol**, v. 30, n. 1, p. 23-32, Jan 2009. ISSN 1471-4906. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19059004> >.

REN, B. et al. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 114-22, Jan 2004. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14688088> >.

RENAULD-MONGÉNIE, G. et al. Induction of mucosal immune responses against a heterologous antigen fused to filamentous hemagglutinin after intranasal immunization with recombinant Bordetella pertussis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 15, p. 7944-9, Jul 1996. ISSN 0027-8424. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8755582> >.

SALCEDO-RIVILLAS, C. et al. Pertussis toxin improves immune responses to a combined pneumococcal antigen and leads to enhanced protection against Streptococcus pneumoniae. **Clin Vaccine Immunol**, v. 21, n. 7, p. 972-81, Jul 2014. ISSN 1556-679X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24807055> >.

SARON, M. F. et al. Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from Bordetella pertussis carrying a CD8+ T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3314-9, Apr 1 1997. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.94.7.3314> >.

SCHLECHT, G. et al. Antigen targeting to CD11b allows efficient presentation of CD4+ and CD8+ T cell epitopes and in vivo Th1-polarized T cell priming. **J Immunol**, v. 173, n. 10, p. 6089-97, Nov 15 2004. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Available at: < <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6089> >.

SEBO, P. et al. Cell-invasive activity of epitope-tagged adenylate cyclase of Bordetella pertussis allows in vitro presentation of a foreign epitope to CD8+ cytotoxic T cells. **Infect Immun**, v. 63, n. 10, p. 3851-7, Oct 1995. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Available at: < <http://dx.doi.org/> >.

SHAPER, M. et al. PspA protects Streptococcus pneumoniae from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5031-40, Sep 2004. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15321996> >.

SINGLETON, R. J. et al. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. **JAMA**, v. 297, n. 16, p. 1784-92, Apr 2007. ISSN 1538-3598. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17456820> >.

SMALLRIDGE, W. E. et al. Different effects of whole-cell and acellular vaccines on Bordetella transmission. **J Infect Dis**, v. 209, n. 12, p. 1981-8, Jun 15 2014. ISSN 0022-1899. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu030> >.

SMITH, A. M.; GUZMAN, C. A.; WALKER, M. J. The virulence factors of Bordetella pertussis: a matter of control. **FEMS Microbiol Rev**, v. 25, n. 3, p. 309-33, May 2001. ISSN 0168-6445 (Print)0168-6445. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00580.x> >.

STAINER, D. W.; SCHOLTE, M. J. A simple chemically defined medium for the production of phase I Bordetella pertussis. **J Gen Microbiol**, v. 63, n. 2, p. 211-20, Oct 1970. ISSN 0022-1287. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4324651> >.

TAI, S. S. Streptococcus pneumoniae protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. **Crit Rev Microbiol**, v. 32, n. 3, p. 139-53, 2006. ISSN 1040-841X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16893751> >.

TARTZ, S. et al. Complete protection against P. berghei malaria upon heterologous prime/boost immunization against circumsporozoite protein employing Salmonella type III secretion system and Bordetella adenylate cyclase toxoid. **Vaccine**, v. 26, n. 47, p. 5935-43, Nov 2008. ISSN 0264-410X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18804138> >.

THORSTENSSON, R. et al. A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine--BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e83449, 2014. ISSN 1932-6203. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083449> >.

TOSTES, R. O. et al. Protection Elicited by Nasal Immunization with Recombinant Pneumococcal Surface Protein A (rPspA) Adjuvanted with Whole-Cell Pertussis Vaccine (wP) against Co-Colonization of Mice with *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170157, 2017. ISSN 1932-6203. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28103277> >.

TU, A. H. et al. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 67, n. 9, p. 4720-4, Sep 1999. ISSN 0019-9567. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10456922> >.

VADESILHO, C. F. et al. Mapping of epitopes recognized by antibodies induced by immunization of mice with PspA and PspC. **Clin Vaccine Immunol**, v. 21, n. 7, p. 940-8, Jul 2014. ISSN 1556-679x. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00239-14> >.

VAN DER ARK, A. A. et al. Resurgence of pertussis calls for re-evaluation of pertussis animal models. **Expert Rev Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1121-37, Sep 2012. ISSN 1744-8395. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151168> >.

VELA CORAL, M. C. et al. Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 5, p. 832-6, 2001 Sep-Oct 2001. ISSN 1080-6040. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11747695> >.

WAHL, B. et al. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000-15. **Lancet Glob Health**, v. 6, n. 7, p. e744-e757, Jul 2018. ISSN 2214-109x. Available at: < [http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x\(18\)30247-x](http://dx.doi.org/10.1016/s2214-109x(18)30247-x) >.

WANG, S. et al. Salmonella vaccine vectors displaying delayed antigen synthesis in vivo to enhance immunogenicity. **Infect Immun**, v. 78, n. 9, p. 3969-80, Sep 2010. ISSN 1098-5522. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20605977> >.

WARFEL, J. M.; ZIMMERMAN, L. I.; MERKEL, T. J. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 2, p. 787-92, Jan 14 2014. ISSN 0027-8424. Available at: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1314688110> >.

WEINBERGER, D. M.; MALLEY, R.; LIPSITCH, M. Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. **Lancet**, v. 378, n. 9807, p. 1962-73, Dec 2011. ISSN 1474-547X. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21492929> >.

WEISER, J. N. The pneumococcus: why a commensal misbehaves. **J Mol Med (Berl)**, v. 88, n. 2, p. 97-102, Feb 2010. ISSN 1432-1440. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898768> >.

WHITNEY, C. G. et al. Decline in invasive pneumococcal disease after the introduction of protein-polysaccharide conjugate vaccine. **N Engl J Med**, v. 348, n. 18, p. 1737-46, May 2003. ISSN 1533-4406. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724479> >.

WHO | Pertussis vaccines position paper. **WHO**, 2015-10-05 11:49:12 2015. Available at: < [https://www.who.int/immunization/policy/position\\_papers/pertussis/en/](https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/pertussis/en/) >.

YANO, A. et al. Potent CTL induction by a whole cell pertussis vaccine in anti-tumor peptide immunotherapy. **Microbiol Immunol**, v. 51, n. 7, p. 685-99, 2007. ISSN 0385-5600. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641471> >.

YOTHER, J.; BRILES, D. E. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of Streptococcus pneumoniae, as revealed by sequence analysis. **J Bacteriol**, v. 174, n. 2, p. 601-9, Jan 1992. ISSN 0021-9193 (Print). Available at: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1729249](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1729249) >.

YOUNG, N. S.; LEVIN, J.; PRENDERGAST, R. A. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. **J Clin Invest**, v. 51, n. 7, p. 1790-7, Jul 1972. ISSN 0021-9738. Available at: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4624351> >.