

LAÉRCIO FABRÍCIO ALVES

**EFEITO DOS ANTICORPOS ANTI-PspA NA AÇÃO LÍTICA DA LACTOFERRINA
SOBRE *Streptococcus pneumoniae***

Bragança Paulista

2012

LAÉRCIO FABRÍCIO ALVES

**EFEITO DOS ANTICORPOS ANTI-PspA NA AÇÃO LÍTICA DA LACTOFERRINA
SOBRE *Streptococcus pneumoniae***

ORIENTADORA: DRA. MICHELLE DARRIEUX SAMPAIO BERTONCINI

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde
da Universidade São Francisco para obtenção
do título de Mestre em Ciências da Saúde.**

Bragança Paulista

2012

WC 217 Alves, Laércio Fabrício.
A48e Efeito dos anticorpos anti-PspA na ação lítica da lactoferrina sobre Streptococcus pneumoniae / Laércio Fabrício Alves. -- Bragança Paulista, 2012.
48 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Orientação de: Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini.

1. Streptococcus pneumoniae. 2. Lactoferrina.
3. Proteínas recombinantes. 4. PspA. I. Bertoncini, Michelle Darrieux Sampaio. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

LAÉRCIO FABRÍCIO ALVES

**EFEITO DOS ANTICORPOS ANTI-PspA NA AÇÃO LÍTICA DA LACTOFERRINA
SOBRE *Streptococcus pneumoniae***

Banca Examinadora

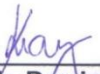
Prof. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini

Profa. Dra. Thalita Rocha

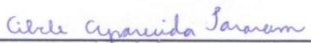
Profa. Dra. Cibele Tararam

Bragança Paulista, 23 de fevereiro de 2012

ALVES, Laércio Fabrício . “ Efeito dos Anticorpos Anti-PspA na ação lítica da Lactoferrina sobre *Streptococcus pneumoniae* ”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em vinte e três de Fevereiro de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



**Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini- Orientadora e Presidente
Universidade São Francisco**



**Profa. Dra. Cibele Aparecida Tararam- Examinadora
Universidade de São Paulo - USP**



**Profa. Dra. Thalita Rocha
Universidade São Francisco**

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA	Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS	Rod. Gen. Milton Tavares de Lima, 1572 - CEP 13083-680 - Distrito de Barão Geraldo - Fone: (19)3754-3300
CÂMPUS DE ITATIBA	Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO	Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036

Dedicatória

Dedico este estudo primeiramente a “DEUS”, pois sem ele, nada seria possível. A toda minha família; em especial à minha mãe Ana Valéria, meu pai Laércio Aparecido (IN MEMORIAM) e minha avó Maria de Lourdes, pelo esforço, dedicação e compreensão, em todos os momentos desta e de outras caminhadas. Desejo que não lhes falte saúde, esperança, alegria e paz.

AGRADECIMENTOS

Chegando à reta final de mais uma importante etapa da minha vida profissional, reservo esse espaço para agradecer a várias pessoas que permitiram que esse sonho se tornasse realidade.

Agradeço inicialmente Aos meus pais e minha avó Maria, meus grandes exemplos de vida. Foram eles que com todo apoio e carinho me permitiram chegar até aqui. Sei que vocês não mediram esforços para ver o meu crescimento profissional e humano e, por isso, não tenho palavras para agradecer toda a dedicação e, especialmente, todo o investimento.

A minha orientadora, Profa Michelle, pelo apoio e disposição para me orientar durante esta etapa de minha vida.

Cris, obrigado pelos conselhos, por estar ao meu lado nas horas conturbadas, pelo incentivo a nunca desistir dos sonhos, e principalmente por me fazer ver que todo momento desta vida é especial e tem um significado.

Aos meus grandes amigos Walter e Cosme, exemplos de dedicação, perseverança e superação. Inicialmente colegas de laboratório e turma, hoje grandes amigos e confidentes. Obrigado pelo companheirismo, ajuda, conselhos, disposição, dedicação, apoio, pelas risadas, e principalmente pelo incentivo aos estudos.

A minha amiga Gabriela, pelas horas dedicadas desde o primeiro dia de laboratório, pelas risadas, pelo apoio e incentivo a não desistir e principalmente pela amizade construída entre nós.

Ao meu amigo Felipe, por estar juntamente comigo, e por acreditar no projeto, mesmo em horas conturbadas, obrigado por compartilhar juntamente comigo toda parte experimental deste estudo.

Ao professor Lucio, pois a cada momento que o procurei recebi muita atenção. Muito obrigado pela colaboração para o desenvolvimento deste estudo e pelas aulas ministradas que foram de grande aprendizado.

À professora Patrícia, exemplo de profissionalismo, muito obrigado pelo apoio durante o desenvolvimento deste estudo, pois muitas vezes necessitei utilizar o material do laboratório.

A minha amiga Carla, companheira de laboratório, obrigado pela ajuda, pois sem sua contribuição, seria muito conturbado desenvolver certas etapas desta dissertação.

A minha amiga Greici, companheira de laboratório, obrigado pela ajuda, pois sua ajuda foi fundamental para a conclusão deste estudo.

Aos meus amigos de laboratório, Leonardo, Ana, Tarsia e Caio que apesar de participarem de outro projeto, compartilharam juntamente comigo horas de estudos e dedicação ao programa de Mestrado.

Aos técnicos de laboratório Lucio e Fabiano, por proporcionar todo apoio para o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus amigos de república, Eduardo e José pela amizade construída durante este período que morei em Bragança Paulista.

Adilson e Marisele, obrigado por me acompanhar até Bragança Paulista nos primeiros dias de Universidade, pois sem ajuda não teria si quer conseguido fazer a entrevista para o processo seletivo. Muito obrigado, que Deus abençoe vocês.

A minha prima Simone, pela ajuda na tradução dos textos científicos.

Ao meu grande amigo Elias, pois sem você jamais teria conseguido atingir mais esta etapa da minha vida, obrigado pelo apoio na hora que mais necessitei.

A Universidade São Francisco - USF, por me oferecer oportunidade e estrutura para concluir mais esta etapa da minha vida acadêmica.

A Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, pelo apoio oferecido quanto ao material teórico deste estudo.

Ao Instituto Butantan por oferecer apoio através da professora Michele para o desenvolvimento deste estudo.

A FAPESP e a CAPES, pelo apoio financeiro, durante o desenvolvimento deste estudo.

"Existem homens que lutam um dia e são bons; existem outros que lutam um ano e são melhores; existem aqueles que lutam muitos anos e são muito bons. Porém, existem os que lutam toda a vida. Estes são os imprescindíveis"

Bertold Brecht

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALF – Apo-lactoferrina

ADP - Adenosina Difosfato

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AK - Acetato Quinase

ATP - Adenosina Trifosfato

CBP - Proteínas Ligantes de Colina

CO₂ - Dióxido de Carbono

DATA-SUS - Sistema de Informação Hospitalar do Sistema Único de Saúde

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade Óptica

EUA - Estados Unidos da América

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HLF – Holo-lactoferrina

IAL - Instituto Adolfo Lutz

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

KDa- kilodalton

LDH - Lactato Desidrogenase

LF – Lactoferrina

LFN - Lactoferricinas

Lox - Lactato Oxidase

LPS - Lipopolissacarídeo A

LTA – Acidolipoteicóico

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCho– fosforilcolina

PCV-7 - Vacina Conjugada Heptavalente

PDHC - Complexo Piruvato Desidrogenase

PNI – Programa Nacional de Imunização

PS - Polissacrídeos Capsulares

PsaA- Antígeno de Superfície de Pneumococo A
PspA - Proteína de Superfície de Pneumococo A
PspC- Proteína de Superfície de Pneumococo C
RNA - Ácido Ribonucleico
PTA – Fosfotransacetilase
PBS – Solução salina tamponada
PBS-T – Solução salina tamponada acrescida de 5% de Tween 20
rPAF - Receptor do Fator de Ativação Plaquetária
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TA – Acido Teicóico
THY – Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura
UFC – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Fragmentos de PspA utilizados neste estudo.....	19
Tabela 02	Isolados de pneumococo utilizados neste estudo	21

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Aspectos Morfológicos de <i>S. pneumoniae</i>	02
Figura 02	História Natural das Infecções de Transmissão Respiratória	04
Figura 03	PspA	09
Figura 04	Interações entre lactoferrina e <i>S. pneumoniae</i>	12
Figura 05	Mecanismo de ação bactericida da lactoferrina.....	14
Figura 06	Dosagem dos anticorpos produzidos em camundongo pela imunização com fragmentos recombinantes de PspA	23
Figura 07	Efeito bactericida de ALF sobre o Isolado St 245/00, PspA clado 1	24
Figura 08	Efeito bactericida de ALF sobre o Isolado A66.1, PspA clado 2	25
Figura 09	Efeito bactericida de ALF sobre o Isolado 94/00	26
Figura 10	Efeito bactericida da ALF sobre o Isolado 3JYP2670, PspA clado 4	27
Figura 11	Efeito de soros contendo anticorpos anti-PspA na morte de <i>S. pneumoniae</i> A66.1 induzida por ALF	28
Figura 12	Efeito de soros anti-PspA na morte de <i>S. pneumoniae</i> 3JYP2670 induzida por ALF	29

RESUMO

Introdução: *Streptococcus pneumoniae* é um dos agentes etiológicos mais importantes que causam infecções no trato respiratório, devido à sua alta incidência, elevada mortalidade e morbidade. É capaz de causar pneumonia, otite, sinusite, meningite e septicemia, afetando indivíduos de todas as idades; porém, sua incidência maior é relatada em crianças menores de dois anos, idosos acima de 65 anos e indivíduos imunodeprimidos. O elevado custo e/ou cobertura limitada das vacinas atuais reforçam a necessidade de se desenvolver uma vacina mais abrangente e acessível para a população. A proteína de superfície de pneumococo A (PspA) é imunogênica e protetora em modelos animais, tendo sido inclusive utilizada com sucesso em ensaio clínico de fase I em humanos. A lactoferrina é uma proteína multifuncional presente no leite humano, na saliva, lágrimas, sêmen e secreções mucosas, que tem grande potencial antimicrobiano e bacteriostático, sendo encontrada na forma livre de ferro (apo-lactoferrina, ALF) ou associada (holo-lactoferrina, HLF). *S. pneumoniae* é capaz de ligar-se à lactoferrina humana, e o receptor bacteriano responsável pela ligação seria a proteína PspA. Dessa forma, é possível inferir que a resposta imune contra PspA poderia interferir em sua interação com ALF, durante as fases iniciais da infecção. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo estudar o papel da PspA e anticorpos anti-PspA na interação entre *S. pneumoniae* e lactoferrina humana *in vitro*. **Metodologia:** fragmentos recombinantes contendo a porção N-terminal de PspAs de diferentes clados e famílias foram utilizados na imunização de camundongos, e a produção de anticorpos foi avaliada por ELISA. Foi avaliado o efeito dos anticorpos na ação lítica da ALF sobre *S. pneumoniae*. **Resultados:** Verificou-se uma maior reatividade cruzada dos anticorpos com PspAs da mesma família. Esse efeito também foi observado no soro de animais imunizados com MBpro; embora esta construção inclua uma região mais conservada de PspA, não houve reconhecimento da PspA de família 2. Diferentes isolados de pneumococo apresentaram graus de susceptibilidade variáveis à ação lítica da lactoferrina *in vitro*, sendo que esta variação não se correlacionou com o tipo de PspA ou de polissacarídeo capsular da bactéria. Por fim, a adição de anticorpos anti-PspA foi capaz de aumentar os efeitos líticos de ALF sobre um isolado de pneumococo, mas não sobre o outro. Diferentemente do observado nos ensaios de ELISA, os anticorpos anti-PspA apresentaram capacidade de aumentar a ação bactericida da ALF independente do grau de homologia entre a PspA indutora dos anticorpos e aquela presente na

superfície do pneumococo. **Conclusão:** Os resultados deste trabalho sugerem que a capacidade dos anticorpos anti-PspA em aumentar a ação lítica da lactoferrina sobre pneumococos depende do isolado bacteriano utilizado, e parece ser devida a uma região da molécula compartilhada entre PspAs de diferentes famílias.

Palavras-Chave: *S. pneumoniae*. Lactoferrina. PspA. Proteínas recombinantes.

ABSTRACT

Introduction: *Streptococcus pneumoniae* is among the most important etiologic agents in respiratory tract infections, with high incidence and elevated mortality and morbidity rates. It can cause pneumonia, otitis, sinusitis, meningitis and septicemia, affecting individuals of all ages, but more particularly children younger than 2 years, elderly over 65 years and immunocompromised individuals. The high cost and limited coverage of the conjugate vaccine underscore the need for developing a vaccine that is more inclusive and cost accessible. The pneumococcal surface protein A (PspA) is immunogenic and protective in animal models, and has been successfully used in phase 1 clinical trial in humans. Lactoferrin is a multifunctional protein present in human milk, spittle, tears, semen and mucus secretions, which has great antimicrobial and bacteriostatic potential, being found in two forms, free (apo-lactoferrin, ALF) or associated with iron (holo - lactoferrin, HLF). *S. pneumoniae* is able to bind to human lactoferrin, and the bacterial receptor responsible for binding is PspA. Thus, it is reasonable to suggest that the immune response against PspA could interfere on its interaction with ALF, during the initial phases of infection.

Objective: The present work aimed at studying the role of PspA and anti-PspA antibodies on the interaction between *S. pneumoniae* and lactoferrin *in vitro*. **Method:** Recombinant fragments including the N-terminal portion of PspAs from different clades and families were used in the immunization of mice, and the production of antibodies was measured by ELISA. The effect of antibodies on the lytic properties of ALF over *S. pneumoniae* was evaluated *in vitro*. **Results:** A higher cross-reactivity was observed among PspAs of the same family, even when MBpro, encoding a more conserved region of the molecule, was used. Different pneumococcal isolates exhibited variable degrees of susceptibility to the lytic effects of lactoferrin *in vitro*, and this variation did not correlate with the bacterial serotype or PspA type. Finally, the addition of anti-PspA antibodies was able to increase ALF activity over one *S. pneumoniae* isolate, but not on a different strain. In contrast with the ELISA results, anti-PspA antibodies presented an ability to increase lactoferrin action independently of the sequence homology between the molecule used to induce the production of the antibodies and that present on the bacterial surface. **Conclusion:** The present results suggest that the ability of anti-PspA antibodies in increasing lactoferrin's lytic activity depends on the bacterial strain that is used, and seems to be due to a conserved sequence, shared by PspAs of different families.

Key words: *S. pneumoniae*; Lactoferrin; PspA; recombinant proteins.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	01
1.1	<i>S. pneumoniae</i> : Características gerais e aspectos epidemiológicos	01
1.2	Patogênese das infecções pneumocócicas	04
1.3	Fatores de virulência e vacinas	06
1.4	Lactoferrina	11
1.5	<i>S. pneumoniae</i> , Lactoferrina e PspA	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	MATERIAL E MÉTODO	19
3.1	Aspectos Éticos	19
3.2	Esquema de Imunização com PspA	19
3.3	Dosagem dos anticorpos anti-PspA no sangue dos camundongos imunizados	20
3.4	Avaliação do efeito bactericida da lactoferrina livre de ferro (ALF) sobre diferentes isolados de pneumococo	21
3.5	Avaliação do efeito dos anticorpos anti-PspA na ação bactericida de ALF sobre <i>S. pneumoniae</i>	22
3.6	Análise Estatístico	22
4	RESULTADOS	23
4.1	Avaliação da produção de anticorpos anti-PspA em camundongos	23
	Determinação do efeito bactericida da ALF sobre diferentes isolados de <i>S. pneumoniae</i>	24
4.2	<i>pneumoniae</i>	24
4.3	Efeito de soros anti-PspA na morte de <i>S. pneumoniae</i> induzida por lactoferrina	28
5	DISCUSSÃO	30
6.	CONCLUSÃO	33
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
	ANEXO I	44
	ANEXO II	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus pneumoniae*: características gerais e aspectos epidemiológicos

Identificado por Sternberg e Pasteur em 1881, *Streptococcus pneumoniae* está entre os agentes etiológicos mais importantes das infecções do trato respiratório e causa doenças com alta incidência de mortalidade e morbidade, como pneumonia, otite, sinusite, meningite e septicemia (Mariott e Dockrell, 2006). Afeta indivíduos de todas as idades, entretanto tem sua incidência maior relatada em crianças menores de dois anos, idosos acima de 65 anos e indivíduos imunodeprimidos, sendo responsável por mais de um milhão de óbitos anualmente (Kadioglu *et al.*, 2008; Malley, 2010). A maioria dos óbitos por doença pneumocócica ocorre em crianças menores de cinco anos que residem em países em desenvolvimento, entretanto, mesmo em países industrializados, a letalidade associada às doenças invasivas causadas pelo *S. pneumoniae* é maior que do que 25% (Brandileone *et al.*, 2003).

Embora indivíduos jovens e previamente tratados com antibióticos apropriados raramente morram devido às doenças pneumocócicas, a morbidade causada pelo *S. pneumoniae* é alta em todas as faixas etárias, principalmente devido à elevada prevalência de otite e sinusite (Bricks, 2000). Em crianças, entretanto, a mortalidade por doenças pneumocócicas é bastante elevada (OMS, 2007); no Brasil, o pneumococo tem sido relatado como a principal causa de infecções em neonatos e em crianças até dois anos de idade, sendo responsável por 45% das pneumonias comunitárias; 27% dos casos de pneumonia em crianças nos países em desenvolvimento e por 70% dos casos de doenças invasivas em menores de dois anos de idade (Ministério da Saúde, 2009a).

Estudos realizados pela Sociedade Brasileira de Imunização (2008) mostraram que a idade é o principal fator de risco no desenvolvimento da doença pneumocócica invasiva, sendo que indivíduos menores de dois anos e os maiores de 60 anos de idade representam os grupos de pacientes nos quais as doenças invasivas ocorrem com mais frequência e gravidade. Entretanto é importante ressaltar que outros fatores atuam como facilitadores da doença, tais como desmame precoce; poluição ambiental; tabagismo e baixo nível sócio-econômico (Franco, 2009).

As elevadas taxas de letalidade das infecções pneumocócicas estão aliadas ao surgimento e à disseminação de cepas resistentes aos antibióticos, fato este que faz com que as pesquisas

sobre novas vacinas para prevenção das infecções por *S. pneumoniae* sejam consideradas uma prioridade no mundo todo (Centers for Disease Control e Prevention, 2000; Carmo, 2010; Braido *et al.*, 2008). Os pneumococos são bactérias extracelulares recobertas por uma cápsula porlissacarídica espessa (Figura 01). A cápsula apresenta estrutura química variável e possui importância diagnóstica, já que diferentes sorotipos conferem variados graus de patogenicidade, e sua distribuição mundial não é homogênea (Einsfeldt, 2010). A sorotipagem da cápsula segue-se ao diagnóstico laboratorial da bactéria, que é realizado através da coloração de Gram de esfregaços provenientes do muco nasal (trata-se de um organismo gram-positivo, com arranjo em forma de diplococos). Os diferentes tipos capsulares são identificados através da reação com anticorpos específicos, em um processo conhecido como reação de Quellung (Yother, 2004). A tipagem sorológica contribui para o rastreamento epidemiológico das infecções pneumocócicas, evidenciando variações geográficas e/ou temporais na prevalência de diferentes sorotipos; situação esta fundamental para o desenvolvimento de vacinas (Kaijalainen *et al.*, 2008).

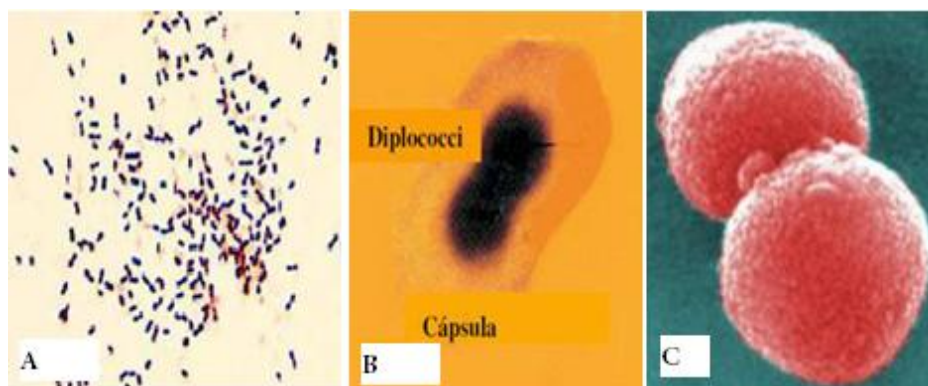


Figura 1. Aspectos morfológicos do *Streptococcus pneumoniae*. (A) Fotomicrografia de uma cultura de *S. pneumoniae* após coloração de Gram, aumento de 400x. (B) Microscopia óptica de *S. pneumoniae*; (C) Imagem microscópica eletrônica de varredura. Adaptado de Darrieux (2007) e Kaijalainen *et al.*, (2008).

A prevalência de sorotipos varia entre diferentes países e grupos etários. Mantese *et al.*, (2003) aponta em um contexto generalista, que os sorotipos que apresentam maior incidência de infecções pneumocócicas em adultos são 14, 3, 9V, 19A, 1, 23F e 7, enquanto em crianças prevalecem os sorotipos 1, 5, 6B, 14, 19F, 7, 9V, 12, 23F.

Segundo Hausdorff *et al.*, (2000) os sorotipos 1 e 5, raramente encontrados nos EUA e Canadá, são freqüentes nos países latino-americanos e em outros países como Israel, África do Sul e Índia. Confirmando estes dados, no Brasil, entre 1977-2000, os sorotipos freqüentemente identificados foram 1, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, sendo 76,5% das cepas isoladas em crianças menores de 5 anos de idade com meningite (Brandileone *et al.*, 2003).

Variações na estrutura da cápsula também influenciam na susceptibilidade da bactérias aos agentes antimicrobianos. Um estudo brasileiro de 2006 aponta os sorotipos já descritos como os principais relacionados à resistência à penicilina, porém em ordem diferente; neste estudo, os sorotipos 14 e 6B foram os principais associados com a resistência a este antibiótico (Brandileone *et al.*, 2006). Os sorotipos 6A, 9V, 14, 19F, 19A e 23 F também estão freqüentemente associados à resistência antimicrobiana devido à sua facilidade em adquirir os genes de resistência e incorporá-los em seu cromossomo pelo processo de transformação genética (Liñares *et al.*, 2010).

Abaixo da cápsula polissacarídica, encontra-se a parede celular, que é composta por peptoglicano, ácido teicóico (TA) e fosforilcolina (PCho). A fosforilcolina atua no ancoramento de um grupo de proteínas pneumocócicas; as proteínas ligantes de colina (CBP), que constituem um importante grupo de fatores de virulência bacterianos, e também funciona como adesina no reconhecimento do receptor do fator de ativação plaquetária (rPAF) das células do hospedeiro (Bergmann; Hammeschmidt, 2006). Mais internamente está a membrana plasmática, à qual estão aderidas algumas proteínas importantes nas fases iniciais da infecção pneumocócica, como a adesina de superfície de pneumococo A (PsaA) (Einsfeldt, 2010).

Com relação ao metabolismo, acredita-se que, sob condições anaeróbias, *S. pneumoniae* seja dependente da fermentação homolática para obtenção da energia necessária para o crescimento, onde a glicose é metabolizada a piruvato e o lactato é o produto final do metabolismo. Entretanto, na presença de oxigênio, o piruvato é convertido a acetato, sendo que o acetil-fosfato é um intermediário capaz de fosforilar ADP gerando ATP pela ação da enzima acetato quinase (AK). Conseqüentemente há formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), CO₂ e acetil-fosfato a partir de piruvato, ortofosfato e O₂ (Taine *et al.*, 2008). A análise do genoma sugere que o pneumococo apresenta vias metabólicas para catabolismo de pentatióis, bem como para celobiose, frutose, galactose, galactitol, glicose, glicerol, lactose, manitol, manose, rafinose, sacarose, trealose e maltossacarídeos (Taine *et al.*, 2008).

1.2 Patogênese das infecções pneumocócicas

O processo de patogênese por *S. pneumoniae* é sempre precedido pela colonização assintomática da nasofaringe (Figura 02), que pode resultar em infecção pela invasão de sítios estéreis, como os brônquios e pulmões, ouvido médio, sangue, e meninges. É também neste estágio de colonização que ocorre a transmissão da bactéria na população, através de contato direto com secreções de indivíduos colonizados (Kaijalainen *et al.*, 2008).

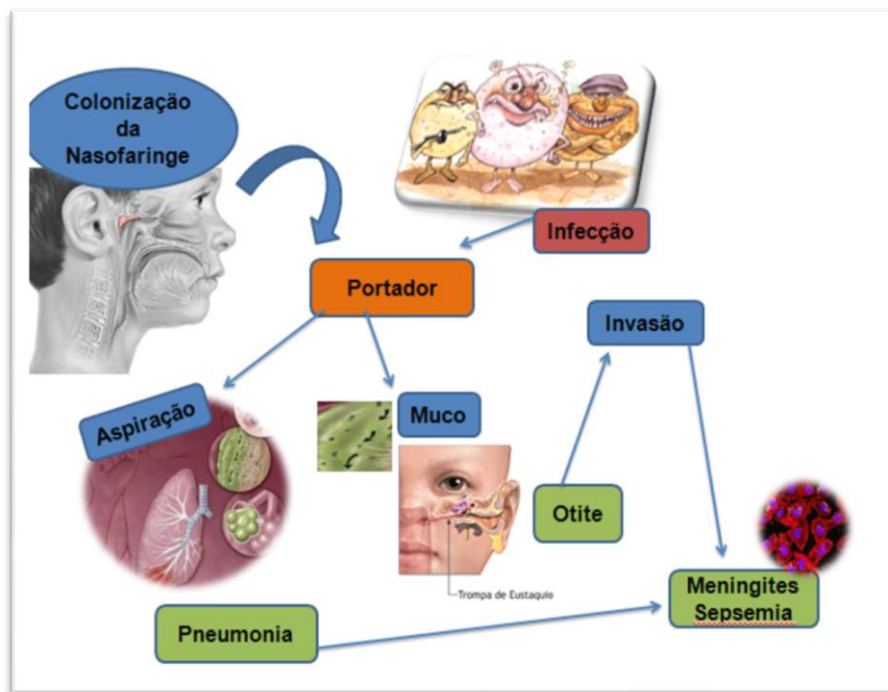


Figura 2. História Natural das Infecções de Transmissão Respiratória. Adaptado da Sociedade Brasileira de Imunizações (2008).

As taxas de colonização das vias aéreas superiores variam de acordo com a faixa etária, raça, estado imunológico, região geográfica e exposição à bactéria (Bricks, 2000). A colonização pelo pneumococo é comum em crianças a partir de seis meses de idade e idosos, sendo menos freqüente em adultos (Hausdorff *et al.*, 2000). Grande parte de indivíduos são colonizados por *S. pneumoniae* durante o primeiro ano de vida, sendo que um único indivíduo pode ter até 4 sorotipos diferentes ao mesmo tempo, durante meses. A aderência dos pneumococos às células

epiteliais humanas ocorre pela ligação de proteínas de superfície bacteriana a carboidratos da superfície de células eucarióticas (Bogaerd *et al.*, 2004).

Após colonizar as mucosas, o *S. pneumoniae* pode passar diretamente para o pulmão ou se disseminar por via hematogênica, como nos casos de septicemia e meningite (Brickset *al.*, 2000). Neste caso, as bactérias atingem a corrente sanguínea através de tecido pulmonar lesionado, ou diretamente por via linfática (Einsfeldt, 2010). Quando comparada às elevadas taxas de colonização das vias aéreas superiores, a incidência de doenças invasivas por pneumococo é relativamente baixa. Isso se deve a diversos fatores, de ordem imunológica ou não, que contribuem para a defesa contra as infecções bacterianas (Bergmann e Hammerschmidt, 2006).

A integridade da mucosa respiratória, a presença de IgA secretora e lisozima nas vias aéreas e o reflexo de tosse impedem a invasão das cavidades do ouvido médio, seios da face e vias aéreas inferiores, enquanto a barreira hematoliquórica dificulta a penetração do *S. pneumoniae* no sistema nervoso central. Quando ocorre supressão dessas defesas naturais, é fundamental a interação entre imunidade celular e humoral, que dependem do número e função normal dos leucócitos, da adequada produção de anticorpos, além da presença de complemento e outros fatores do soro, que facilitam a opsonização, fagocitose e destruição do pneumococo (Bricks *al.*, 2000).

A fagocitose do *S. pneumoniae* só é eficiente após sua opsonização por anticorpos de classe IgG, processo no qual o baço desempenha dupla função, a produção de anticorpos e remoção de bactérias incompletamente opsonizadas da circulação; assim, a asplenia acarreta risco elevado de infecção por *S. pneumoniae* e outras bactérias encapsuladas, como meningococo (Hausdorff *et al.*, 2000).

Outros fatores como hábito de fumar, cirrose, aspectos nutricionais inadequados, AIDS e deficiências congênitas envolvendo imunoglobulina ou componentes do sistema complemento aumentam o risco de desenvolvimento de infecções pneumocócicas (Bogaert *et al.*, 2004).

Na presença de uma ou mais condições favoráveis, os pneumococos ganham acesso ao pulmão por aspiração (Figura 02), onde aderem às células alveolares e, devido à fagocitose ineficiente, multiplicam-se nos alvéolos e liberam citocinas no fluido bronquealveolar, comprometendo assim o parênquima pulmonar com um processo inflamatório intenso.

1.3 Fatores de virulência e vacinas

Segundo Einsfeldt (2010), pode-se considerar como fatores de virulência componentes celulares que agem na invasão, aderência e colonização ou que são capazes de provocar uma resposta inflamatória no organismo hospedeiro. Embora o pneumococo possua uma ampla gama de fatores de virulência, neste estudo foi abordados apenas a cápsula polissacarídica e proteína de superfície de pneumococo A.

A cápsula polissacarídica, que possui em torno de 200 a 400 nm de espessura, é a principal responsável pela virulência do *S. pneumoniae*, inibindo a fagocitose da bactéria pelos leucócitos polimorfonucleares (Barocchi *et al.*, 2007). A cápsula apresenta outros papéis importantes como a prevenção da lise mediada pelo complemento; inibição da aderência às células do hospedeiro e também encobre a parede celular, reduzindo o processo inflamatório (Ventura *et al.*, 2006). As propriedades antifagocitárias da cápsula proporcionam resistência à autólise espontânea ou induzida por antibióticos, contribuindo assim para a tolerância das bactérias a antibióticos (Bogaert *et al.*, 2004).

Os polissacarídeos capsulares (PS) são imunogênicos e anticorpos antipolissacárides conferem proteção sorotipo-específico à doença pneumocócica, devido a seu efeito opsonizante. Em geral, no indivíduo saudável com mais de dois anos de idade a doença pneumocócica é pouco freqüente, graças à imunidade adquirida pela produção de anticorpos antipolissacárides, induzidos durante a colonização prévia da nasofaringe (Kadioglu *et al.*, 2008; Barocchi *et al.*, 2007).

Devido à sua elevada imunogenicidade e contribuição para a virulência da bactéria, os polissacarídeos capsulares são a base das formulações vacinais atualmente em uso contra pneumococos. Atualmente existem dois tipos de vacinas contra *S. pneumoniae* disponíveis no mercado, conhecidas como vacinas polissacarídicas e vacinas conjugadas, sendo que ambas utilizam como antígenos os polissacarídeos capsulares. A vacina polissacarídica é composta por 23 polissacarídeos capsulares purificados de diferentes sorotipos de *S. pneumoniae* (sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F) (Braido *et al.*, 2008; Pletz *et al.*, 2008). Esta vacina é eficaz em adultos e crianças maiores de dois anos, no entanto, tem baixa eficácia em imunocomprometidos, idosos e crianças com menos de

dois anos, devido à ausência de linfócitos B maduros que induzem uma melhor resposta contra carboidratos (Bogaert *et al.*, 2004; García-Suárez *et al.*, 2006; Pletz *et al.*, 2008).

As vacinas conjugadas contêm polissacarídeos quimicamente fusionados a proteínas carreadoras não-pneumocócicas, como toxóides. Em 2000, foi licenciada uma formulação heptavalente (PCV-7), composta por polissacarídeos capsulares de 7 sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), prevalentes como causa de infecções invasivas (Pletz *et al.*, 2008). Os polissacarídios presentes são conjugados ao toxóide diftérico CRM 197 (detoxificado geneticamente) (Braido *et al.*, 2008). Esta vacina tem se mostrado eficaz em crianças, no entanto, ela possui cobertura limitada de sorotipos e custo elevado, fato este que muitas vezes inviabiliza seu comércio no programa nacional de vacinação em países em desenvolvimento (Bogaert *et al.*, 2004; Barocchi *et al.*, 2007). A vacina 10 valente, desenvolvida pela empresa GlaxoSmithKline Biologicals (GSK), apresenta mais 3 sorotipos (1, 5 e 7F) além daqueles presentes na PCV-7. Esta vacina possui 8 polissacarídeos capsulares conjugados com a proteína D de *H. influenzae* (Wysocki *et al.*, 2009). Através de acordo de transferência de tecnologia entre o Ministério da Saúde brasileiro e a empresa GSK, a vacina 10-valente passou a fazer parte do Calendário Básico de Vacinação do Programa Nacional de Imunização (PNI) a partir de março de 2011 (Ministério da Saúde, 2010c,d). A vacina 13-valente, desenvolvida pela empresa Wyeth inclui, além dos 7 sorotipos presentes na PCV-7, os sorotipos 1, 3, 5, 6A, 7F e 19A. Os polissacarídios presentes nesta vacina também são conjugados ao toxóide diftérico CRM 197 (detoxificado geneticamente). É estimado que esta vacina aumente a cobertura das doenças pneumocócicas invasivas em 89% na Europa, 92% nos Estados Unidos e Canadá, 86% na Oceania, 87% na África e América Latina e 73% na Ásia (Grimprel, 2009).

A despeito dos crescentes avanços no desenvolvimento de vacinas conjugadas, a busca por alternativas com custo reduzido e ampla cobertura persiste. Neste contexto, as proteínas de superfície representam alternativas vacinais promissoras, capazes de induzir respostas imunes fortes e de ampla cobertura (Jedrzejewski, 2001b; Bogaert *et al.*, 2004; García-Suárez *et al.*, 2006; Ogunniyi *et al.*, 2007; Barocchi *et al.*, 2007).

A superfície do pneumococo é decorada por proteínas que desempenham papel fundamental na virulência deste microrganismo, como pneumolisina, neuraminidase, PsaA, PspC e PspA (García-Suárez *et al.*, 2006). Destas, a Proteína de superfície de Pneumococo A (PspA) tem mostrado resultados promissores em diversos modelos animais (Briles *et al.*, 2000a; García-

Suárez *et al.*, 2006), tendo sido inclusive utilizada com sucesso em um ensaio clínico de fase 1 em humanos (Briles *et al.*, 2000b).

PspA é um fator de virulência exposto, sorologicamente variável e presente em todos isolados de pneumococo, com uma massa molecular que pode variar entre 67 e 99 KDa (Briles *et al.*, 2000; Yother e White, 1994). A proteína madura é composta por 4 regiões: uma porção N-terminal rica em α -hélices e com carga negativa, uma região rica em resíduos de prolina, um domínio de ligação à colina e uma cauda C-terminal de 17-20 aminoácidos com caráter hidrofóbico (Figura 3) (Yother e White, 1994).

A extremidade C-terminal é composta por 10 repetições de 20 aminoácidos conservados e é responsável por manter a proteína presa à superfície do pneumococo (Jedrzejewski, 2001b). A região N-terminal inclui a maior parte dos epitopos imunogênicos da proteína, identificados através de anticorpos monoclonais (McDaneil *et al.*, 1994). Esta região compreende a porção funcional de PspA, e sua estrutura negativa faz com que seja repelida pela cápsula, projetando-se para o exterior da bactéria (Briles *et al.*, 2000; Gor *et al.*, 2005; Bergmann *et al.*, 2006) .

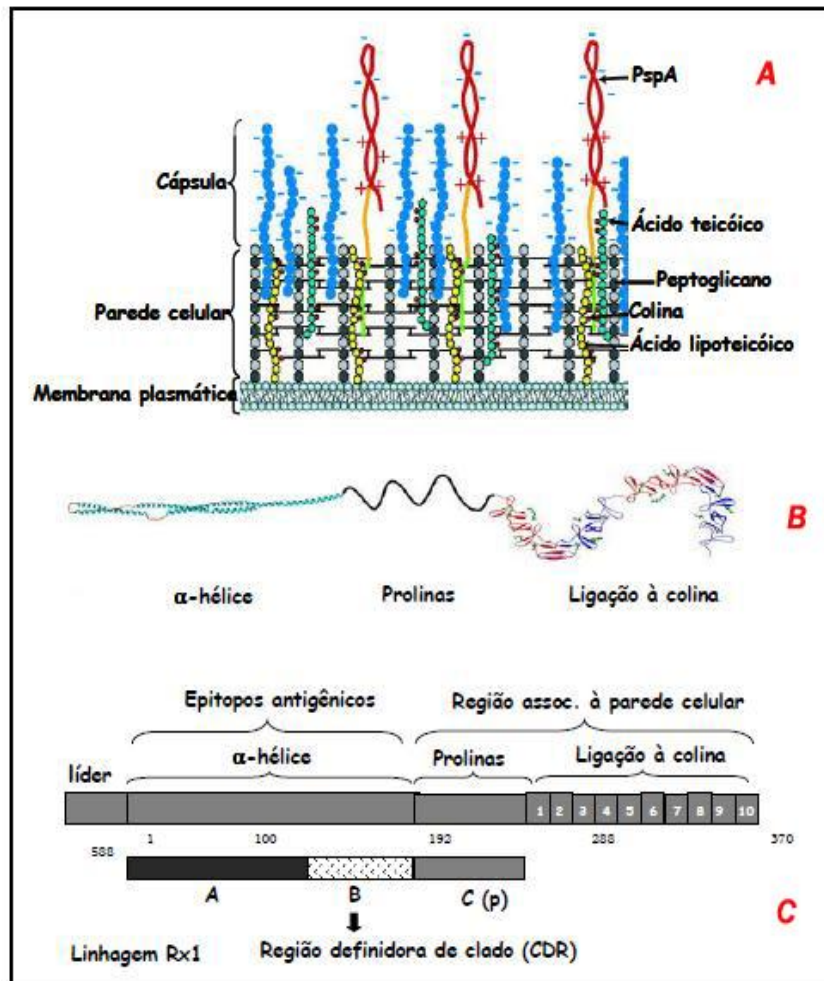


Figura 3. PspA. (A) Diagrama esquemático de PspA e sua inserção na superfície de *S. pneumoniae*. (B) Modelo da molécula. (C) Esquema dos domínios estruturais da PspA. Adaptado de Hollingshead *et al.*, (2000) e Darrieux (2007).

Em contraste com o elevado grau de conservação da região C-terminal entre os diferentes isolados de pneumococo, a região N-terminal da molécula apresenta elevada variabilidade estrutural. Hollingshead *et al.*, (2000) criaram um sistema de classificação de PspA, com base em variações na região B, que compreende a segunda metade da porção N-terminal (figura 3). Ao analisar as seqüências gênicas das PspAs extraídas de um grupo de 24 pneumococos foi detectada uma estrutura com característica mosaica altamente complexa. Seis grupos mutuamente distintos em mais de 20% na região B (também chamada de região definidora de clado - CDR) foram identificados, e definidos como clados 1 a 6. Os clados, por sua vez, foram agrupados em três

famílias, sendo que a Família 1 inclui clados 1 e 2, a Família 2 inclui clados 3, 4 e 5 e a Família 3 o clado 6, sendo essa última a mais raramente encontrada (Ochs *et al.*, 2008).

Proteínas dentro do mesmo clado apresentam uma similaridade maior ou igual a 90% na região B. As três famílias de PspA divergem uma da outra em mais de 45% nesta região (Hollingshead *et al.*, 2000).

As diferentes PspAs apresentam graus de prevalência distintos, sendo as famílias 1 e 2, especialmente os clados 1 a 4 estão presentes em cerca de 99% dos isolados clínicos de pneumococo (Hollingshead *et al.*, 2000; Brandileone *et al.*, 2004).

A variabilidade estrutural de PspA implica em elevada variabilidade sorológica, justificada pela sua localização de fácil acesso para os anticorpos (Bogaert *et al.*, 2004).

Diversos estudos sobre a reatividade cruzada dos anticorpos anti-PspA demonstraram uma correlação direta entre a similaridade da seqüência de aminoácidos e o grau de reação cruzada dos anticorpos (Miyaji *et al.*, 2002; Tai, *et al.*, 2006; Darrieux *et al.*, 2007). No entanto, trabalhos recentes sugerem que existe uma variação na capacidade de diferentes PspAs de induzir anticorpos com reatividade cruzada. Assim, algumas moléculas seriam mais efetivas em induzir anticorpos capazes de reconhecer PspAs distintas do que outras (Darrieux *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2010; Goulart *et al.*, 2011).

A PspA influencia diretamente a interações do microrganismo com o hospedeiro por interferir na ativação e deposição da fração C3b do complemento na superfície bacteriana; como consequência, a fagocitose mediada por esse fator opsonizante é prejudicada (Briles *et al.*, 2003; Payne *et al.*, 2005; Kadioglu *et al.*, 2008). Estudos posteriores demonstraram que PspA atua como inibidor da ativação de complemento mediada por fator B *in vivo*, e como inibidor da deposição de C3b e seu processamento *in vitro* (Ren *et al.*, 2004). As propriedades anti-complementares de PspA são imprescindíveis à sobrevivência do pneumococo após a invasão de sítios estéreis, como o pulmão e a corrente sanguínea, que estão repletos de componentes do sistema complemento.

Além dos efeitos protetores que PspA exerce sobre o pneumococo na fase invasiva, foi demonstrado que PspA interfere com componentes da mucosa, como a lactoferrina, sugerindo um possível efeito sobre a colonização (Hakansson *et al.*, 2001; Shaper *et al.*, 2004).

1.4 Lactoferrina

A lactoferrina (LF) é uma glicoproteína de 80 kilo Daltons (kD), positivamente carregada, pertencente à família das transferrinas. Descoberta a mais de 60 anos, tem sido objetivo de intenso estudo estrutural e funcional, desde que foi purificada a partir de leite, por apresentar atividade antiinflamatória, enzimática e antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias, fungos, leveduras, vírus e parasitas multicelulares (ANEXO I) (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009; Jenssen e Hancock, 2009; Baker e Baker, 2005; Velliyagounder *et al.*, 2003).

Trata-se de uma proteína multifuncional presente no leite humano, na saliva, lágrimas, sêmen e secreções mucosas, que tem grande potencial antimicrobiano e bacteriostático, além de estar presente nos grânulos secundários de neutrófilos (Baker e Baker, 2009; Legrand; *et al.*, 2005; Vorland, 1999).

A lactoferrina é composta por uma cadeia polipeptídica simples dobrada em dois lobos simétricos (N e C) altamente homólogos, ligados por uma dobradiça flexível com conformação de α -hélice entre os aminoácidos 333 e 343. A cadeia polipeptídica, com 703 aminoácidos no total, inclui os aminoácidos 1-332 para o lobo N e 344-703 para o lobo C. Cada lobo é formado por dois domínios, nos quais se insere um átomo de Ferro, em sinergia com o íon carbono (CO_3^{2-}) (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009).

A porção N-terminal do lobo N sofre proteólise pela ação de fatores do hospedeiro (como pepsina) ou de proteases bacterianas (como PrtA de *S. pneumoniae*) – e libera peptídeos ricos em aminoácidos carregados positivamente e com alguns resíduos de triptofano– chamados lactoferricinas (LFN), capazes de desestabilizar membranas bacterianas carregadas negativamente (Gifford *et al.*, 2005), conforme demonstrado na figura 4-A.

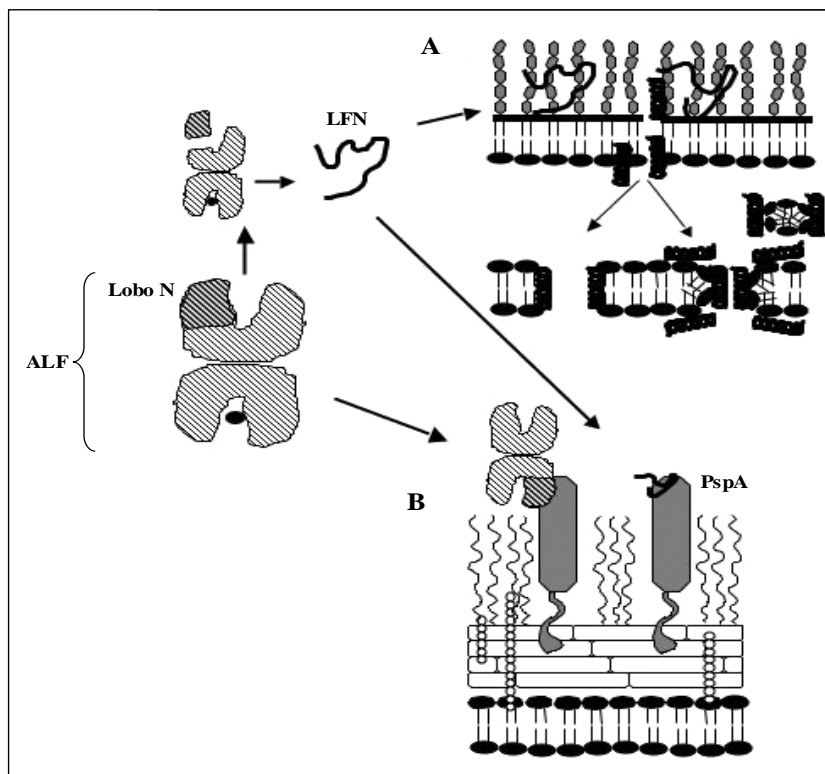


Figura 4. Interações entre lactoferrina e *S. pneumoniae*. O lobo N da lactoferrina (ALF) sofre clivagem proteolítica, gerando peptídeos bactericidas conhecidos como lactoferricinas (LFN). (A) Na ausência de PspA, LFN insere-se na membrana plasmática do pneumococo, desestabilizando-a. (B) Na presença de PspA, o acesso de ALF e LFN à membrana do pneumococo é bloqueado, e a bactéria fica protegida. Adaptado de Ling e Schryvers (2006).

As moléculas de lactoferrina podem existir em uma forma livre de ferro (apo-lactoferrina, ALF) ou associada (holo-lactoferrina, HLF). É importante ressaltar que apo-lactoferrina tem uma conformação aberta, enquanto holo-lactoferrina é uma molécula fechada com maior resistência à proteólise (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009; Levay e Viljoen, 1995).

Apo-lactoferrina mostrou-se eficaz em inibir a multiplicação intracelular de *Legionella pneumophila* em culturas celulares (Goldoni *et al.*, 2000) e de bloquear o crescimento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* em camundongos (Schaible *et al.*, 2002).

O espectro de ação antimicrobiana da lactoferrina envolve diversos mecanismos, tornando-a eficaz contra uma ampla gama de patógenos, incluindo fungos, vírus e bactérias.

A atividade antimicrobiana da lactoferrina ocorre através de vários mecanismos: ligada ao ferro, que é um elemento essencial para o crescimento microbiano, privando as células bacterianas de sua utilização; ligada à bactéria, promovendo a perda da integridade e morte da célula bacteriana; estimulando a fagocitose por macrófagos e monócitos; impedindo as bactérias de se ligarem às vilosidades intestinais, tornando-as incapazes de colonizar e se multiplicar (Baker e Baker, 2009).

Vários mecanismos de ação têm sido propostos para efeitos antivirais da lactoferrina, sendo o mais aceito atualmente, a capacidade da lactoferrina de se ligar e bloquear os receptores de glicosaminoglicanas virais, especialmente o sulfato de heparan, impedindo a infecção (Van Der Strate *et al.*, (2001).

Kirkpatrick *et al.*, (1971) realizaram os primeiros estudos demonstrando a função anti-fúngica da lactoferrina contra *Cândida spp.*, onde foi relatada sua capacidade de sequestrar Fe^{3+} . Também foi observada alteração da permeabilidade da superfície celular de *Cândida Albicans*, e *Cândida krusei*, como descrito para as bactérias (Bellamy *et al.*,1993; Takakura *et al.*, 2003). Mais recentemente Zarembek *et al.*, (2007) mostraram que o sequestro de Fe^{3+} por neutrófilos é um mecanismo importante para a defesa do hospedeiro contra *Aspergillus Fumigatus*.

Van Der Strate *et al.* (2001) relataram em seus estudos que a lactoferrina também possui atividade antiviral contra uma gama de vírus RNA e DNA, que possui capacidade de infecção tanto no homem como em animais. Estudos demonstraram que lactoferrina também possui ação contra vírus não envelopados, tais como adenovírus e enterovírus; além de apresentar forte atividade contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), exercendo uma inibição da replicação viral na célula hospedeira (Seganti *et al.*, 2004; Viani *et al.*, 1999).

Outros estudos demonstraram que a lactoferrina pode bloquear a vinculação do poliovírus tipo 1, vírus herpes simples tipo I e II e citomegalovírus à célula hospedeira (Marchetti *et al.*,1999; Hasegawa *et al.*, 1994; Beljaars *et al.*, 2004). Já para o vírus da hepatite C e rotavírus, lactoferrina inibe a replicação viral na célula hospedeira (Ikeda *et al.*, 2000; Superti *et al.*, 1997).

A lactoferrina é considerada um componente chave na primeira linha de defesa do hospedeiro, devido à sua capacidade de responder a uma série de alterações fisiológicas e ambientais; exercer atividade bactericida, bacteriostática, fungicida e anti-viral *in vitro*, em

sinergismo ou não com outros componentes antibacterianos, como a lisozima e as imunoglobulinas (Garofalo, 1999; Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009).

A atividade bacteriostática da lactoferrina tem sido amplamente documentada *in vitro* e *in vivo* para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. A Tabela 01 mostra as bactérias contra as quais lactoferrina demonstrou efeito inibitório, sendo que algumas das bactérias listadas são classificadas como resistentes a antimicrobianos, como as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Klebsiella pneumoniae* (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009).

A função bacteriostática da lactoferrina atribui-se à sua capacidade de sequestrar o íon Fe^{3+} , limitando a utilização deste nutriente por bactérias no local da infecção e inibindo o crescimento destes microorganismos, bem como a expressão de seus fatores de virulência, ocorrendo assim interrupção do processo pelo qual a bactéria metaboliza carboidratos (Hernández e Serrano, 2005; Orsi, 2004).

Segundo Gonzalez-Chavez *et al.*, (2009) a função bactericida (Figura 5) tem sido atribuída à interação direta com superfícies bacterianas.

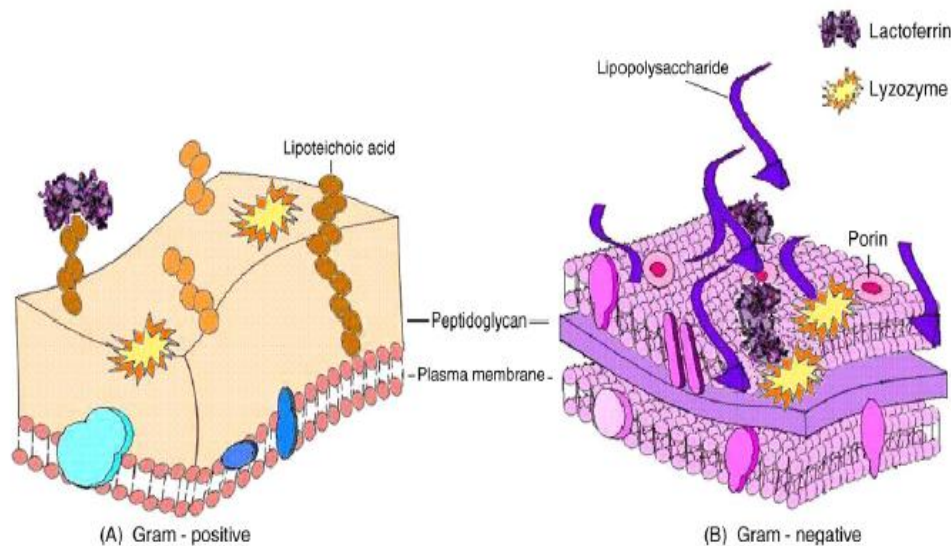


Figura 5. Mecanismo de ação bactericida da lactoferrina. (A) Gram-positivas: lactoferrina liga-se a moléculas com carga negativa da membrana celular, tais como ácido lipoteicoico, neutralizando a carga da parede, permitindo a ação de outros compostos antibacterianos, como lisozima. (B) Bactérias Gram-negativas: lactoferrina pode ligar-se ao lipopolissacarídeo A (LPs), causando a liberação lipídica, com conseqüente dano à membrana celular. Adaptada de Gonzalez-Chavez *et al.*, (2009).

Segundo Hammerschmidt *et al.*, (1999) a atividade bactericida está relacionada diretamente com a porção N-terminal da proteína, que possui elevadas concentrações de peptídeos carregados positivamente, capazes de desestabilizar membranas bacterianas carregadas negativamente. O potencial catiônico da lactoferrina permite sua interação por atração eletrostática com as cargas negativas de componentes da membrana externa, induzindo a liberação de moléculas presentes nestas membranas e, levando à desestabilização e conseqüente perda de permeabilidade, que culmina com a lise da bactéria (Sallmann *et al.*, 1999; Appelmelk *et al.*, 1994).

As diferenças existentes na composição da membrana plasmática de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas têm implicações para um modo específico de ação antimicrobiana. As bactérias Gram-negativas possuem estruturas mais complexas que as Gram-positivas, em função da presença de uma membrana composta de lipopolissacarídeos, fosfolipídeos, lipoproteínas e proteínas (Reyes *et al.*, 2005).

Danos à membrana externa de bactérias Gram-negativas decorrem da interação com LPS, pois o lobo N-terminal da lactoferrina tem interação entre LPs e cátions (Ca^{2+} e Mg^{2+}) causando assim a liberação de LPs a partir da parede celular, ocasionando assim o aumento da permeabilidade da membrana, ocasionando assim danos à bactéria (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009).

O mecanismo de ação da lactoferrina contra bactérias Gram-positivas é baseado no seu mecanismo de ligação, onde existe carga líquida positiva de moléculas aniônicas na superfície bacteriana, tais como o ácido lipoteicóico, que resulta em uma redução da carga negativa da parede celular e favorecendo assim o contato entre lisozima e o peptidoglicano subjacente sobre a qual exerce um efeito enzimático (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009).

Serrano (2006) descreve que tanto em *in vitro* como *in vivo* a lactoferrina tem mostrado a capacidade de impedir a fixação de determinadas bactérias na célula hospedeira, mecanismo este que os estudos sugerem que pode estar relacionado às adesinas bacterianas, que impede a interação com receptores das células hospedeiras.

Recentemente, tem sido demonstrado que o papel antimicrobiano da lactoferrina pode ser mais complexo, pois pode aumentar as moléculas de lipopolissacarídeos das células bacterianas, assim, sensibilizando os microrganismos aos antibióticos e à ação da lisozima, que atua

especificamente sobre a bactéria, clivando o peptoglicano de sua parede e potencializando a ação da IgA e do complemento (Grassi *et al.*, 2001).

1.5 *S. pneumoniae*, Lactoferrina e PspA

Foi demonstrado que *S. pneumoniae* é capaz de ligar-se à lactoferrina humana, e que o receptor bacteriano responsável pela ligação é a proteína PspA (Hammerschmidt *et al.*, 1999). Inicialmente foi sugerido que o pneumococo utilizaria holo-lactoferrina (HLF) como fonte de ferro; estudos posteriores, porém, demonstraram que esta bactéria não consegue seqüestrar ferro ligado à HLF (Tai *et al.*, 1993).

Foi proposto então que PspA atuaria sobre a ação bactericida direta de ALF, o que foi comprovado pela observação de que pneumococos PspA negativos são mais sensíveis à morte por ALF do que aqueles contendo PspA (Hakansson *et al.*, 2001).

Hakansson *et al.*, (2001) demonstraram o domínio de ligação à ALF em PspA está localizado na região de α -hélice, e corresponde aos aminoácidos 168-288 da molécula de PspA da cepa Rx1 (Figura 3-C). Posteriormente Shaper *et al.*, (2004) identificaram um peptídeo de 11 aminoácidos localizado no final da região B – peptídeo SM-1 – presente em todos os clados de PspA e responsável pela ligação à ALF.

Foi obtida a estrutura cristalizada de um complexo formado pelo domínio de ligação à ALF de PspA (correspondente aos aminoácidos 168-288 de Rx1) e o lobo N da ALF (Senkovich *et al.*, 2007); esta estrutura revelou a presença de interações específicas entre a superfície negativa das hélices de PspA e o peptídeo catiônico lactoferrina (LFN), presente no lobo N. A capacidade de PspA em reconhecer LFN ligada à lactoferrina sugere que esta proteína pneumocócica previne o acesso de proteases que fariam a clivagem do lobo N, inibindo a liberação do peptídeo bactericida LFN. Como PspA também é capaz de reconhecer LFN livre, pode-se inferir que mesmo após a proteólise da ALF e liberação de LFN, PspA ainda é capaz de prevenir a morte de pneumococos, bloqueando o acesso deste peptídeo à membrana plasmática da bactéria (Hakansson *et al.*, 2001).

Foi demonstrado também que a adição de PspA recombinante reduz os efeitos bactericidas da ALF sobre o pneumococo, possivelmente porque a ligação entre PspA e lactoferrina previne a proteólise deste última e a conseqüente inserção das lactoferrinas na

membrana bacteriana (Shaper *et al.*, 2005). De forma contrária ao observado com as PspAs recombinantes, a presença de anticorpos anti-PspA potencializa o efeito bactericida da ALF sobre *S. pneumoniae* (Shaper *et al.*, 2004); essa ação possivelmente se deve ao bloqueio, pelos anticorpos, do sítio de PspA responsável pela interação com a lactoferrina, permitindo que haja produção de lactoferrinas e sua ação sobre a superfície de bactéria.

Uma vez que todas as doenças pneumocócicas são precedidas pela colonização da nasofaringe, a compreensão dos mecanismos responsáveis pela eliminação do patógeno neste sítio poderá contribuir para o desenvolvimento de vacinas eficazes e abrangentes. Devido ao importante papel da lactoferrina na imunidade das mucosas, a investigação da amplitude e dos efeitos de sua interação com o pneumococo fornecerá pistas sobre uma possível prevenção do processo de colonização. Considerando que PspA é a molécula responsável pela inibição da ação lítica da lactoferrina sobre o pneumococo, a imunização com PspA poderia induzir proteção não apenas contra doença invasiva, mas também contra colonização, através da ativação dos mecanismos de “clearance” mediados por ALF. Devido à variabilidade estrutural e sorológica de PspA, no entanto, é necessário analisar qual/quais fragmentos de PspA são capazes de interagir de forma eficiente com a lactoferrina. Assim, o presente estudo propôs a investigação da habilidade de anticorpos contra diferentes fragmentos recombinantes de PspA em potencializar a ação bactericida de ALF sobre a bactéria.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as interações entre *S. pneumoniae*, PspA e lactoferrina humana *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o grau de susceptibilidade de pneumococos de diferentes sorotipos e PspAs à ação da ALF *in vitro*;
- Estudar o papel dos anticorpos anti-PspA na ação bactericida de ALF sobre diferentes isolados *S. pneumoniae*;
- Avaliar a reatividade cruzada dos anticorpos e proteínas recombinantes na ação da ALF, utilizando PspAs de famílias distintas.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa Animal de Universidade São Francisco (Anexo II). Foram utilizados 30 camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 5 e 7 semanas no início do experimento. Os animais, provenientes do CEMIB (Unicamp) foram alojados em gaiolas contendo 6 animais cada, e mantidos em regime de água e ração *ad libitum*. Ao término do experimento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

3.2 Esquema de imunização com PspA

Para a imunização dos animais, foram utilizados fragmentos recombinantes de PspAs de diferentes clados e famílias, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Fragmentos de PspA utilizados neste estudo.

Fragmentos	Clado de PspA	Região da PspA	Referências
PspA245	1	ABC	Goulart <i>et al.</i> , 2011
PspA94	2	ABC	Goulart <i>et al.</i> , 2011
PspA3	3	ABC	Darrieux, 2007
MBpro	1	Três regiões C fusionadas ao peptídeo SM-1	Darrieux, 2007

Os camundongos foram divididos em 5 grupos, conforme o antígeno vacinal, a seguir:

Grupo 1: Controle negativo. Injetados com Alum

Grupo 2: PspA 245

Grupo 3: PspA 94

Grupo 4: PspA 3

Grupo 5: MBpro

Todos os grupos foram imunizados pela via intraperitoneal (ip) com 3 doses das proteínas recombinantes (sendo 5µg/animal/dose), utilizando-se 50µg de Alum como adjuvante. O volume final de cada imunização foi de 500µL, diluídos em solução salina estéril. As doses foram aplicadas em intervalos de 15 dias. Dez dias após a última imunização, foram coletados 200µL de sangue por punção retro-orbital de cada animal. Após a coleta, o sangue dos animais foi incubado a 4°C durante 16 horas, para melhor separação das frações. O material foi centrifugado a 500g durante 10 minutos, e o plasma coletado com auxílio de uma pipeta e armazenado a -20°C até o momento da dosagem dos anticorpos.

3.3 Dosagem dos anticorpos anti-PspA no sangue dos camundongos imunizados

A presença de anticorpos anti-PspA nos diferentes grupos imunizados foi determinada por ELISA contra as proteínas recombinantes. As placas foram inicialmente incubadas com as proteínas diluídas em tampão Carbonato-Bicarbonato 50 mM, pH=9,6 (1 µg/ml) e permaneceram a 4 °C durante 16 h. Nos poços onde seria feita a curva, foi colocado o anticorpo IgG total (padrão), fazendo diluições seriadas no mesmo tampão carbonato-bicarbonato, iniciando a curva pela concentração de 2µg/ml. Após esse período, as placas foram incubadas por 30 min a 37 °C e lavadas 3 vezes com PBS (Solução salina tamponada) (pH 7,2) + Tween 20 (0,05%) – PBS-T. O bloqueio foi realizado com leite desnatado 10% em PBS (200 µL/poço), a 37°C por 30 min, seguido por 3 lavagens em PBS-T. O soro obtido dos camundongos imunizados foi adicionado em diluições sequenciais em PBS/BSA 1% (100 µL/ poço) e incubado a 37 °C durante 1 h. Mais 3 lavagens foram realizadas com PBS-T, e o anticorpo (goat anti-mouse IgG total-Sigma) diluído em PBS/BSA para uma concentração de 1:10000, foi adicionado (100 µL/poço). Após 1 hora de incubação, as placas foram novamente lavadas 3 vezes, e o conjugado (anti-IgG de camundongo peroxidase – Sigma) diluído em PBS/BSA para uma concentração de 1:20000, foi adicionado(100 µL/poço). Após 1 hora de incubação, as placas foram novamente lavadas 3 vezes, e o substrato (0,4 mg/mL de O-fenilenediamina (OPD) em 10 mL de tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 5,0 e 10 µL de H₂O₂), adicionado (100 µL/poço). Após 10 min de incubação no escuro, a reação foi bloqueada com H₂SO₄ 4 M (50 µL/poço) e a absorbância das amostras a 492 nm foi determinada. As concentrações dos anticorpos foram determinadas pela correlação com a curva padrão gerada a partir da diluição de IgG total.

3.4 Avaliação do efeito bactericida da lactoferrina livre de ferro (ALF) sobre diferentes isolados de pneumococo

O efeito bactericida de ALF sobre pneumococos foi avaliado utilizando-se o protocolo descrito por Shaperet *al* (2002). Inicialmente os diversos isolados de pneumococos (Tabela 2) foram retirados de uma temperatura de -80°C, onde foram descongelados em temperatura ambiente e plaqueados (20µl de cada amostra) em meio Agar sangue, onde posteriormente foi realizado incubação por 24 horas à 37°C em anaerobiose. No dia seguinte as colônias bacterianas foram transferidas para um tubo de ensaio com auxílio de um “swabs” onde havia 5ml de meio THY (Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura), até atingir DO_{600nm} entre 0.4 e 0.5. Após está etapa do experimento, um novo tubo de ensaio foi preparado com 5ml de meio THY (Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura) associado a 100µl do cultivo bacteriano realizado anteriormente. Cultivos em meio THY (Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura) foram realizados até DO_{600nm} entre 0.1 e 0.2. Após atingir DO desejável, 1ml de cada cultivo foi centrifugado a 8.000 rpm/min por 10 minutos e descartado o sobrenadante, no qual foi adicionado 1ml de solução salina. Nova centrifugação foi realizada e por fim adicionado 1ml de tampão de lactoferrina com pH = 7.2 (150mM NaCl, 1mM MgCl. 50µM CaCl e 1mM K₂PO₄) a cada amostra e incubados na presença de ALF (lactoferrina) em diferentes concentrações durante uma hora a 37°C. Em seguida, foram realizadas 06 diluições seriadas de cada amostra, e uma alíquota de 10µL de cada diluição foi plaqueada em meio de Ágar sangue e incubada por 24 horas a 37°C, em anaerobiose para contagem das colônias bacterianas.

Tabela 2. Isolados de pneumococos utilizados neste estudo.

Isolados	Sorotipos	PspA (clado)	Fontes
245/00	14	1	Inst Adolpho Lutz
A66.1	3	2	UAB
94/00	19F	2	Inst Adolpho Lutz
3JYP2670	3	4	UAB

3.5 Avaliação do efeito dos anticorpos anti-PspA na ação bactericida de ALF sobre *S. pneumoniae*

Para avaliação do papel dos anticorpos anti-PspA na ação de ALF, foi repetido o protocolo descrito acima, porém adicionando-se às amostras soro (4µl de cada amostra) dos animais imunizados com as proteínas recombinantes em uma concentração final de 1%. Como controle, utilizou-se soro de animais imunizados com Alum.

3.6 Análise estatística

As comparações entre os grupos foram realizadas pelo análise de variáveis Anova, e posteriormente foi usado Tuckey para analisar as variáveis entre os grupos. O software utilizado para análise foi o GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da produção de anticorpos anti-PspA em camundongos

Como pode ser observado na figura 06, a imunização com a porção N-terminal de PspA245 (clado 1) induziu elevados níveis de anticorpos contra PspAs de família 1 (PspA245), enquanto o reconhecimento de PspA de família 2 (clado 3) não foi diferente do grupo controle negativo (grupo Alum). PspA 94, por outro lado, induziu níveis significativos de anticorpos capazes de reconhecer cruzadamente PspA 3, comparáveis ao reconhecimento de PspAs de família 1, com sequências mais similares ($p < 0,05$ comparado ao controle negativo). Nenhum dos fragmentos contendo a região N-terminal de PspA foi capaz de induzir níveis significativos de anticorpos contra a região conservada C (representada pelo fragmento MBpro, que contém 3 regiões C fusionadas). Por outro lado, o fragmento MBpro induziu anticorpos capazes de reconhecer a porção N-terminal de PspAs da família 1 ($p < 0,05$), mas não da família 2 (PspA3).

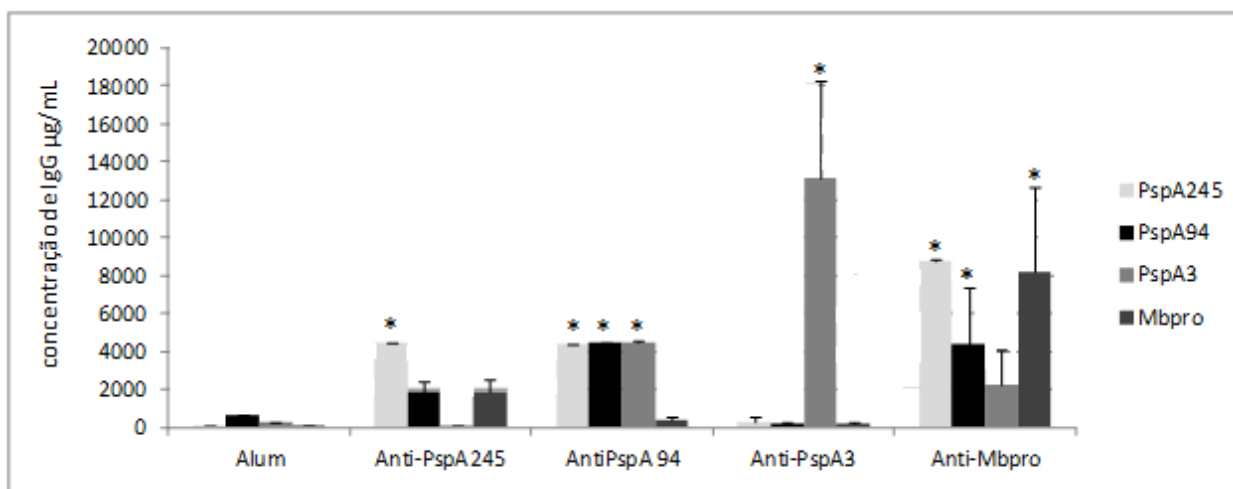


Figura 06. Dosagem dos anticorpos produzidos em camundongo pela imunização com fragmentos recombinantes de PspA. Soro de animais injetados com três doses de Alum, PspA245, PspA94, PspA3 ou MBpro, foram analisados por ELISA contra cada proteína recombinante. As barras indicam a concentração de anticorpos em cada grupo, reativos contra as diferentes proteínas recombinantes. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (soro alum).

4.2 Determinação do efeito bactericida da ALF sobre diferentes isolados de *S. pneumoniae*

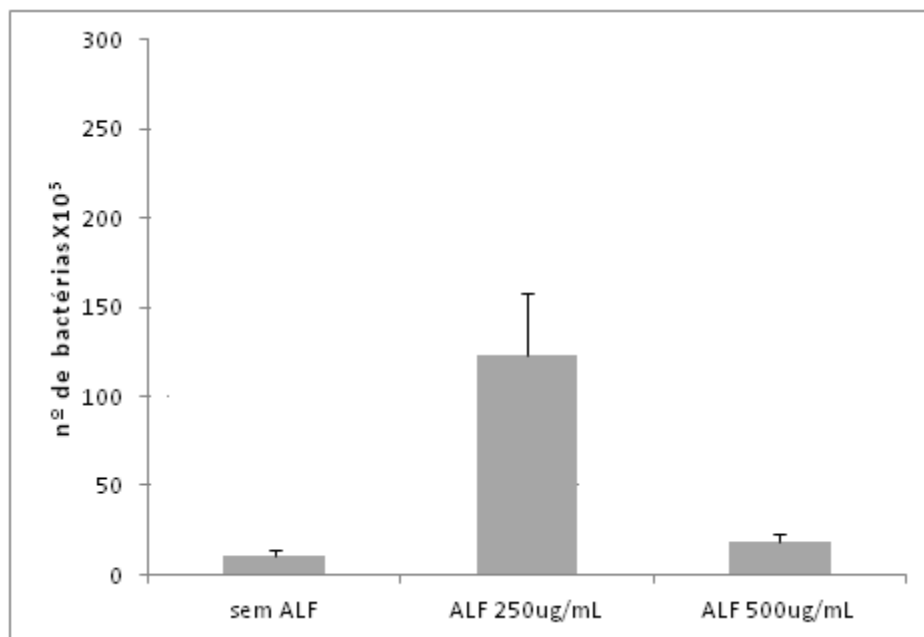


Figura 07. Efeito bactericida de ALF sobre o Isolado St 245/00, PspA clado 1. Os cultivos foram incubados na presença de 250mM ou 500mM de ALF por uma hora, diluídos e plaqueados. O número de bactérias que sobreviveram ao tratamento é mostrado para cada grupo.

A figura 07 mostra os resultados do tratamento do isolado St 245/00 com duas concentrações de ALF. Pode-se observar um número maior de bactérias no grupo tratado com ALF em relação ao controle, indicando que este isolado bacteriano não se mostrou susceptível à ação bactericida de ALF em nenhuma das concentrações testadas.

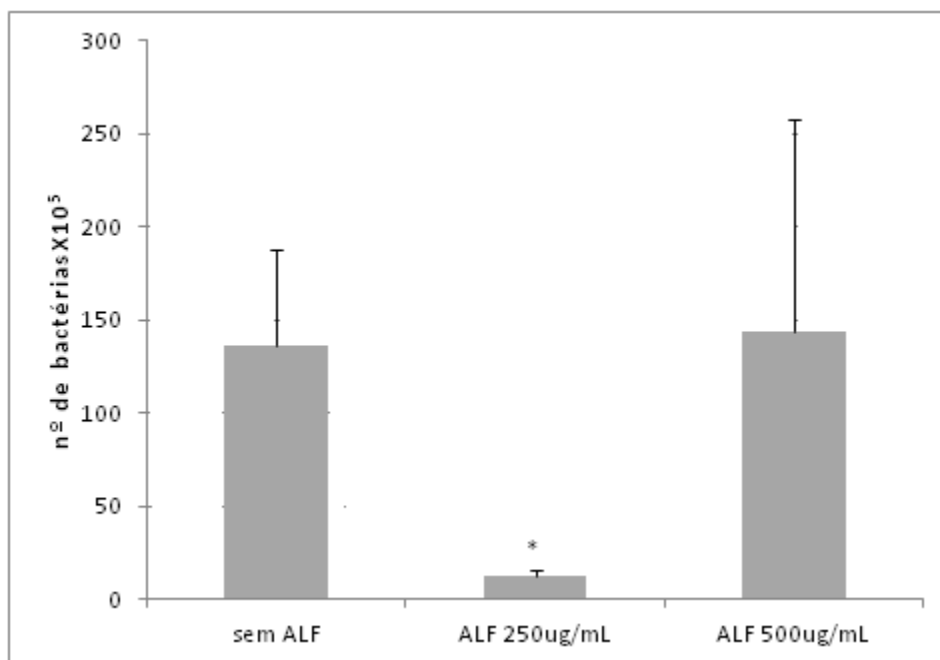


Figura 8. Efeito bactericida de ALF sobre o Isolado A66.1, PspA clado 2. Os cultivos foram incubados na presença de 250mM ou 500mM de ALF por uma hora, diluídos e plaqueados.* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (sem ALF).

A figura 8 mostra os resultados do tratamento da bactéria A66.1 com ALF. Neste isolado, apenas a menor concentração de ALF apresentou efeito bactericida ($p < 0,05$) quando comparada com o controle, sugerindo que o aumento na concentração de ALF pode ter efeito inibitório sobre sua ação lítica.

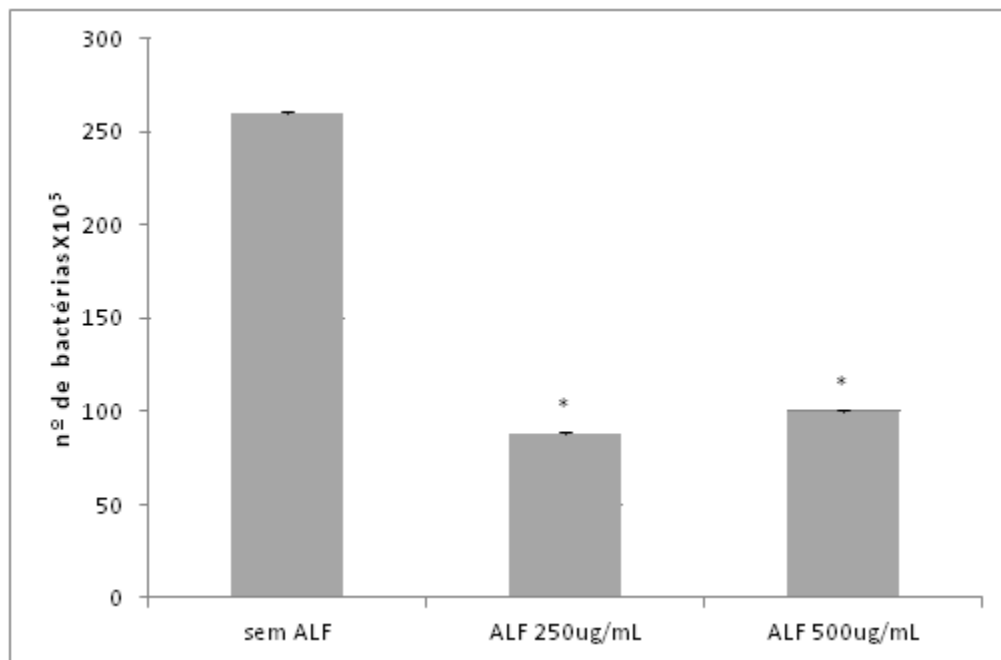


Figura 9. Efeito bactericida de ALF sobre o Isolado 94/00, PspA clado 2.

Os cultivos foram incubados na presença de 250mM ou 500mM de ALF por uma hora, diluídos e plaqueados.* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (sem ALF).

A figura 9 demonstra os resultados do tratamento do isolado 94/00 com ALF. Em contraste ao observado para o isolado St 245/00 (onde não houve lise pela ALF) e para A66.1 (onde apenas a menor concentração de ALF foi eficaz em promover a lise bacteriana), neste isolado foi verificada uma redução significativa no número de bactérias após o tratamento com as duas doses de ALF testadas. No entanto, os níveis de redução das bactérias foram semelhantes nos dois grupos tratados, indicando que o efeito não foi dependente da dose de ALF utilizada.

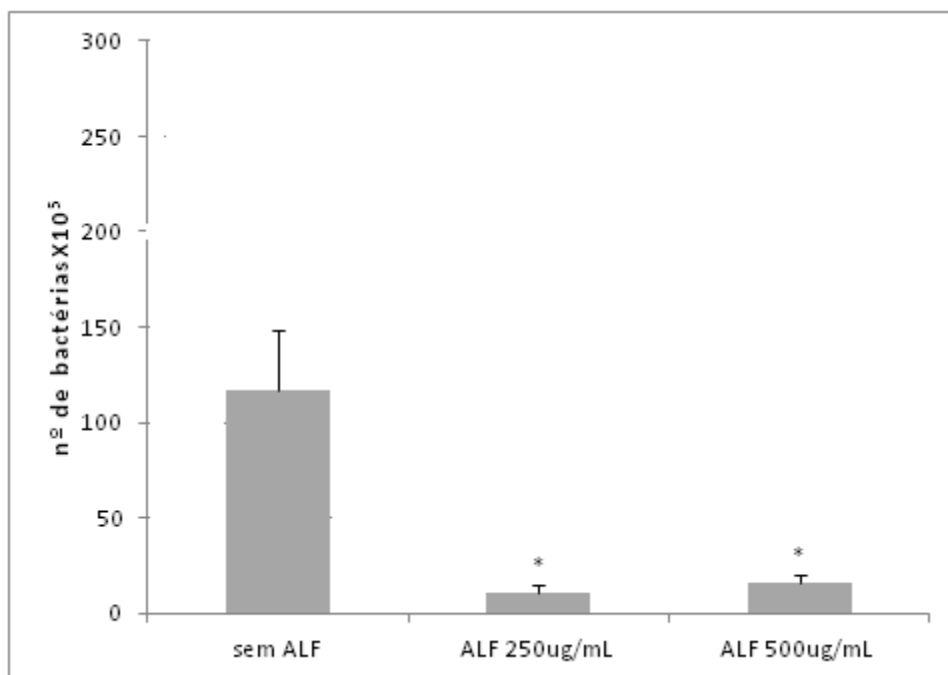


Figura 10. Efeito bactericida da ALF sobre o Isolado 3JYP2670, PspA clado 4. Os cultivos foram incubados na presença de 250mM ou 500mM de ALF por uma hora, diluídos e plaqueados.* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle (sem ALF).

Analisando-se a figura 10, é possível verificar que as duas concentrações de ALF foram capazes de reduzir significativamente ($p < 0,05$) o número de pneumococos, confirmando assim a ação bactericida da ALF sobre *S. pneumoniae*. Conforme observado para o isolado 94/00, não houve diferença significativa entre as duas concentrações de ALF analisadas.

Em conjunto, os resultados indicaram uma variação na susceptibilidade de diferentes isolados de *S. pneumoniae* à ação bactericida de ALF *in vitro*, sendo assim essencial ajustar o melhor percentual (250 ou 500 $\mu\text{g/ml}$) de ALF utilizado para cada isolado bacteriano. A bactéria St 245/00 mostrou-se a mais resistente entre os isolados testados, não havendo lise por ALF em nenhuma das concentrações utilizadas; os isolados A66.1, St 94/00 e 3JYP2670 foram sensíveis à menor concentração de ALF, que foi portanto selecionada para a análise do efeito dos anticorpos anti-PspA.

4.3 Efeito de soros anti-PspA na morte de *S. pneumoniae* induzida por ALF

Uma vez determinada a susceptibilidade de cada isolado de pneumococo ao efeito lítico da ALF, foi avaliada a contribuição dos anticorpos anti-PspA neste mecanismo. Os isolados de pneumococo A66.1 e 3JYP2670 foram incubados na presença de ALF 250mM e de soro de camundongos imunizados com fragmentos recombinantes de PspA94, PspA3 e MBpro (Soros anti-PspA). Como controle foi utilizado soro de animais imunizados com alum. O número de bactérias viáveis após tratamento foi calculado para cada grupo, e os resultados são mostrados nas figuras 11 e 12.

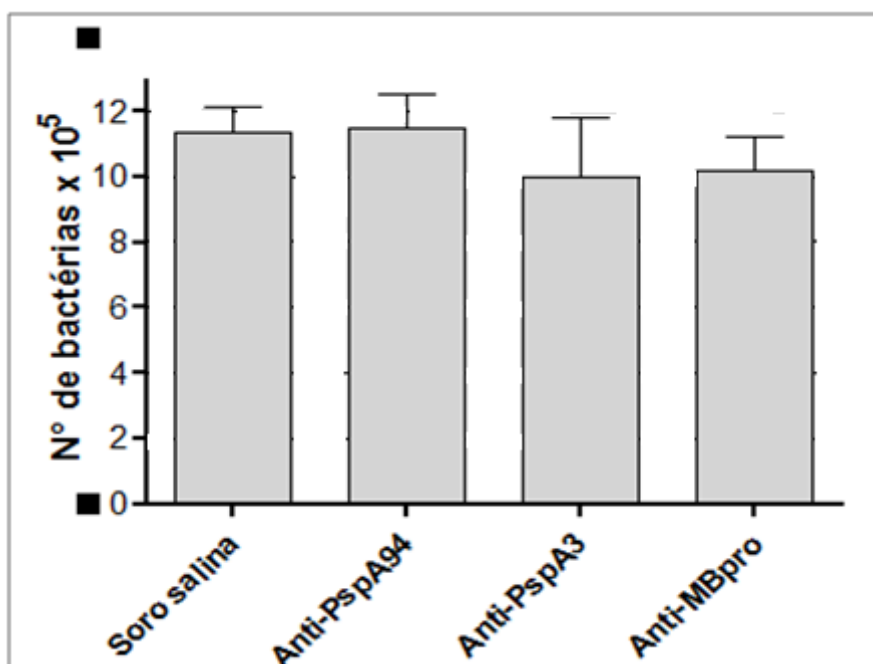


Figura 11. Efeito de soros contendo anticorpos anti-PspA na morte de *S. pneumoniae* A66.1 induzida por ALF. Os cultivos foram incubados na presença de 250mM de ALF e 1% de soro dos animais imunizados com as diferentes proteínas recombinantes por uma hora, diluídos e plaqueados. As barras representam o número de UFCs em cada grupo após o tratamento.

Analisando-se a figura 11, embora seja possível observar uma tendência de redução no número de bactérias após incubação na presença dos anticorpos anti-PspA3 e anti-MBpro, não houve diferenças significativas em relação ao grupo controle. Em contraste, para a bactéria 3JYP2670 (Figura 12), os anticorpos anti-PspA foram capazes de aumentar significativamente a ação bactericida da ALF ($p < 0,05$ para anti-PspA94; $p < 0,01$ para anti-PspA3 e anti-MBpro). Não houve diferenças entre os diferentes anticorpos.

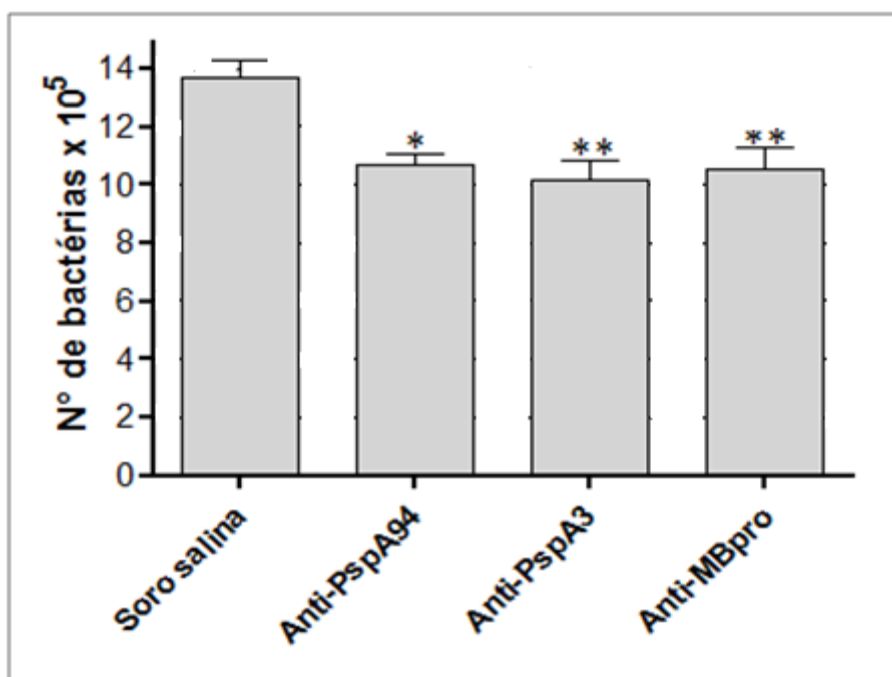


Figura 12. Efeito de soros anti-PspA na morte de *S. pneumoniae* 3JYP2670 induzida por ALF. Os cultivos foram incubados na presença de 250mM de ALF e 1% de soro dos animais imunizados com as diferentes proteínas recombinantes por uma hora, diluídos e plaqueados. As barras representam o número de UFCs em cada grupo após o tratamento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle (tratado com ALF e soro da animais imunizados com Alum, aqui denominado soro salina).

5. DISCUSSÃO

A proteína de superfície de pneumococo A (PspA) é um importante candidato vacinal contra *Streptococcus pneumoniae*, e tem se mostrado protetora em diferentes modelos animais (Briles *et al.*, 2000a; Garcia-Suárez *et al.*, 2006), tendo sido inclusive utilizada com sucesso em um ensaio clínico de fase 1 em humanos (Briles *et al.*, 2000b).

Em particular, a região N-terminal da molécula concentra a maior parte dos epitopos protetores, e está relacionada às suas propriedades anti-complementares. No entanto, a elevada variabilidade estrutural da proteína PspA torna necessária uma avaliação aprofundada do grau de reconhecimento cruzado dentro desta família de proteínas, a fim de se avaliar a cobertura de uma vacina baseada em PspA (Darrieux, 2007). Dessa forma, o presente trabalho avaliou, inicialmente, a reatividade cruzada entre anticorpos gerados pela imunização de camundongos com fragmentos recombinantes de PspAs dos clados 1, 2 e 3. Em geral, foi observada uma correlação direta entre o grau de reatividade e a similaridade de sequência protéica (o fragmento de PspA245 induziu anticorpos reativos contra família 1, enquanto PspA3 induziu anticorpos apenas contra a família 2). O fragmento que inclui uma região mais conservada de PspA, MBpro, foi capaz de reconhecer PspAs de família 1, mas não PspA3, fato este que gera uma suposição de que não existiu indução de anticorpos contra PspA3 pelo fato desta região não existir bloco motor.

A reatividade cruzada entre PspAs de diferentes clados e famílias tem sido objeto de intenso estudo, com resultados variáveis. Dados recentes sugerem que o grau de reconhecimento cruzado varia entre PspA dos clados e famílias diferentes (Darrieux *et al.*, 2008, Moreno *et al.*, 2010), e dentro de um mesmo clado (Goulart *et al.*, 2011). O estudo demonstrou que mesmo com a inclusão de regiões mais conservadas da molécula, como no híbrido MBpro, não foi possível obter elevado grau de reatividade cruzada, sugerindo a necessidade de se incluir mais de um fragmento de PspA para ampliar sua cobertura.

Os pneumococos apresentam, no curso das infecções invasivas que provocam, um fenômeno conhecido como variação de fase. Este consiste em alterações no padrão de expressão de fatores de virulência quando o microrganismo passa da mucosa onde promoveu a colonização inicial para os tecidos estéreis, como pulmão ou meninges. Um dos fatores que tem sua expressão aumentada neste processo é PspA, e assim postulou-se que a principal função desta proteína

residiria na proteção contra infecção sistêmica. Uma série de trabalhos sustentam este modelo, mostrando a elevada capacidade de PspA em inibir a deposição de complemento na superfície bacteriana, um mecanismo eficiente de escape durante as infecções invasivas (Ren *et al.*, 2003; Darrieux *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2010).

No entanto, um grupo crescente de trabalhos tem sugerido um possível papel protetor de PspA também nas fases iniciais da infecção. Em 2003, McCool *et al.* verificaram que, em um modelo experimental de colonização em indivíduos saudáveis, a resistência à colonização relacionava-se diretamente à presença de anticorpos anti-PspA prévios nos pacientes, indicando que uma exposição ao pneumococo induz anticorpos anti-PspA que são protetores contra re-infecção. Fato este que pode explicar as colocações da Organização Mundial de Saúde em 2003, que as re-infecções causadas por *S. pneumoniae* tem se tornado cada dia mais resistente a tratamento terapêutico.

Um estudo de outro grupo demonstrou que a imunização com PspA co-administrada à PsaA confere proteção contra colonização em camundongos (Briles *et al.*, 2000c); de forma semelhante, a imunização intranasal com PspA e IL-12 reduziu o número de bactérias na mucosa dos camundongos (Arulanandam *et al.*, 2001).

Foi demonstrado que o pneumococo é capaz de ligar-se à lactoferrina, e que o receptor bacteriano responsável pela interação é PspA (Hammerschmidt *et al.*, 1999). Inicialmente foi sugerido que pneumococo utilizaria HLF como fonte de ferro; entretanto estudos posteriores demonstraram que esta hipótese era inviável, pois pneumococos não conseguiam seqüestrar ferro ligado à HLF (Tai, *et al.*, 1993). Após análise dos estudos iniciais, foi proposto que PspA atuaria sobre a ação bactericida direta de ALF, o que foi comprovado pela observação de que pneumococos PspA negativos são mais sensíveis à morte por ALF do que aqueles contendo PspA (Hakansson, *et al.*, 2001).

Devido ao importante papel da lactoferrina na imunidade de mucosas, foram investigados os efeitos desta interação. Verificou-se que bactérias sem PspA são susceptíveis à ação lítica da lactoferrina livre de ferro, sugerindo um mecanismo de proteção mediado por PspA nas mucosas (Hankansson, *et al.*, 2001). Com base nestes resultados, o presente trabalho avaliou o potencial bactericida de ALF sobre diferentes isolados de pneumococo, de sorotipos diferentes e portando PspAs distintas. Foi verificada grande variação na resistência das bactérias à lise por ALF; enquanto 3JYP2670 e St 94/00 foram bastante susceptíveis à ação de ALF, St 245/00 foi

altamente resistente. Uma sugestão para esta variação pode ser o resultado de diferenças no tipo e concentração de polissacarídeos que compõem a cápsula, bem como variações na estrutura de PspA, que refletem em sua capacidade de ligar-se à ALF. Variações na susceptibilidade de pneumococos à ALF já foram reportada em outros estudos (Shaper *et al.*, 2004), e não foi observada nenhuma correlação direta entre grau de susceptibilidade e tipo de cápsula ou de PspA, sendo neste estudo também avaliado diversas concentrações de ALF em busca da melhor concentração.

Finalmente, foi avaliado o potencial de anticorpos anti-PspA em aumentar a ação lítica de ALF sobre pneumococos. Das duas bactérias testadas, em apenas uma (3JYP2670) Foi observada uma redução significativa no número de UFC após incubação com ALF e anticorpos. Entre os diferentes soros avaliados, não houve diferenças na capacidade em aumentar a ação de ALF. Estes resultados indicam que a eficácia do soro anti-PspA em potencializar o efeito bactericida de ALF sobre o pneumococo não depende da homologia entre a PspA indutora dos anticorpos e aquela presente na superfície bacteriana. Uma vez que a região de PspA que interage com a lactoferrina é conservada entre moléculas de diferentes clados e famílias (Shaper *et al.*, 2004), é possível que todos os fragmentos analisados tenham induzido anticorpos contra essa região, que foram capazes de bloquear o sítio de interação de PspA com a ALF, permitindo assim a proteólise desta última, com liberação de peptídeos de ação lítica e conseqüente morte da bactéria.

6. CONCLUSÃO

- Fragmentos recombinantes contendo a porção N-terminal de PspAs de diferentes clados e famílias induziram a produção de anticorpos com capacidades de reconhecimento cruzado distintas, sendo que em geral, uma maior reatividade foi observada entre moléculas de mesma família;
- Um fragmento incluindo uma região mais conservada de PspA, MBpro, induziu anticorpos capazes de reconhecer moléculas de família 1, mas não da família 2;
- Diferentes isolados de pneumococo apresentaram elevada variabilidade no grau de susceptibilidade à ação lítica da ALF;
- A adição de anticorpos anti-PspA foi capaz de aumentar os efeitos líticos de ALF sobre um isolado de pneumococo, mas não sobre o outro;
- O potencial dos anticorpos anti-PspA em aumentar a lise bacteriana por ALF não é dependente da homologia entre a PspA presente na superfície do pneumococo e aquela utilizada para produção do soro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Appelmelk, B. J.; *et al.* Lactoferrin is a LipidA-binding protein. **Infect Immun.**, 62(6):2628-2632, 1994.

Arulanandam, B. P. Intranasal Vaccination with Pneumococcal Surface Protein A and Interleukin-12 Augments Antibody-Mediated Opsonization and Protective Immunity against *Streptococcus pneumoniae* Infection. **Infect Immun**, 69(11): 6718–6724, 2001.

Barocchi, M. A.; *et al.* Vaccines in the era of genomics: the pneumococcal challenge. **Vaccine**, 25(16):2963-73. 2007.

Baker, E. N.; Baker, H. M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. **Biochimie**, 91(1):03-10, 2009.

Baker, E. N.; Baker, H. M. Molecular Structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. **Cell Mol Life Sci.**, 62(22): 2531-2539, 2005.

Beljaars, L.; *et al.* Inhibition of cytomegalovirus infection by lactoferrin in vitro and in vivo. **Antiviral Res.**, 63(3):197–208, 2004.

Bellamy, W.; *et al.* Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. **Med Microbiol Immunol**, 182(2):97–105, 1993.

Bergmann, S.; Hammerschmidt, S. Versatility of pneumococcal surface proteins. **Microbiology**, 152:295-303, 2006.

Bogaert, D.; *et al.* Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. **Vaccine**, 22(17):2209-20, 2004.

Braido, F.; *et al.* The role of pneumococcal vaccine. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, 21(4):608-15, 2008.

Brandileone, M. C. C.; *et al.* Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **JID**, 187(8):1206-12, 2003.

Brandileone, M. C. C.; *et al.* Increase in numbers of β -lactam-resistant invasive *S. pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **J Med Microbiol** 55: 567-574, 2006.

Brandileone, M. C. C.; *et al.* Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine**, 22(30):3890-6, 2004.

Bricks, L. F. Vacina Antipneumocócica. In: Calil K. F.; *et al.* **Imunização: fundamentos e prática**. 4^o edição. São Paulo: Atheneu, 2000, p. 467-481.

Briles, D. E.; *et al.* Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. **J Infect Dis** 182: 1694-1701, 2000b.

Briles D. E. *et al.* Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *S. pneumoniae*. **J Infect Dis**. 188:339-348, 2003.

Briles, D. E.; *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**, 68:796-800, 2000c.

Briles, D. E. *et al.* The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine**. 18:1707-1711, 2000a.

Carmo, T. S. **Otimização da produção de polissacarídeo capsular do *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B em biorreator**. 129. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Centers for Disease Control e Prevention. Preventing pneumococcal disease among infants and young children. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morb Mortal Wkly**, 49(9):01-35, 2000.

Dagan, R. M. D.; FRASCH, C. M. D. Introduction. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 28(4):63-65, 2009.

Darrieux, M. et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **J Med Microbiol**. 57(3):273-8, 2008.

Darrieux, M. **Expressão, purificação e avaliação imunológica de formas truncadas e híbridos da proteína de superfície de pneumococo A (PspA)**. 136. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Dawson, C. What is a pneumococcus? In: Tuomanen E, et al. The pneumococcus. 2 ed. Washington, D. C. **ASM**. 30-48, 2004.

Einsfeldt, K. **Seleção, clonagem e expressão de uma proteína associada à virulência de *Streptococcus pneumoniae***. 150. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Farnaud, S.; Evans, R. W. Lactoferrin: a multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molecular Immunology** 40(7):395-405, 2003.

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.**, 48(6):205-13, 2010.

García-Suárez, M. M.; et al. *Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: an update. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 24(8):512-7, 2006.

Garofalo, R. P.; Goldman, A. S. Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk. **Clin Perinatol.**, 26(2):361-377, 1999.

- Gifford, J. L.; *et al.* Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. **Cell Mol Life Sci.**, 62(22):2588-98, 2005.
- Goldoni P.; *et al.* Metal complexes of lactoferrin and their effect on the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. **Biometals**, 13(1):15-22, 2000.
- Gonzalez-Chavez, S. A.; *et al.* Lactoferrin: structure, function and applications. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 33(4):301-308, 2009.
- Gor, D. O.; *et al.* Relationship between surface accessibility for PpmA, PsaA, and PspA and antibody-mediated immunity to systemic infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun.**, 73(3):1304-12, 2005.
- Goulart, C.; *et al.* Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**.29(8):1634-42, 2011.
- Grassi, M. S.; *et al.* Métodos laboratoriais para diagnóstico da infecção neonatal precoce pelo *Streptococcus* beta hemolítico do grupo B. **Pediatria**, 23(3):232-40, 2001.
- Grimprel, E. Corticosteroids in children with bacterial meningitis: indications and administration. **Med Mal Infect.** 39(7-8):539-46, 2009.
- Hakansson, A.; *et al.* Characterization of the binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A (PspA). **Infect Immun.**, 69 (5):3372-81, 2001.
- Hammerschmidt, S.; *et al.* Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, 67 (4):1683-87, 1999.
- Hasegawa, K.; *et al.* Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. **Jpn J Med Sci Biol.**, 47(2):73-85, 1994.

Hausdorff, W. P.; *et al.* Which pneumococcal serogroups cause most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part 1. **Clin Infect Dis.**,30(1):100-121, 2000.

Hernández, M.; Serrano, M. E. D. El hierro and la virulencia bacteriana. **Enf Inf Microbiol.**, 25(3):104-107, 2005.

Hollingshead, S. K.;*et al.* Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, 68(10):5889-5900, 2000.

Ikedai, M.; *et al.* Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis c virus infection in human cultured cells. **Virus Res.**, 66(1):51–63, 2000.

Jedrzejewski, M.J.; Lamani, E; Becker, RS. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. *J Biol Chem*, 276:33121-8, 2001a.

Jedrzejewski, M.J. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 65(2):187–207, 2001b.

Jenssen, H.; Hancock, R. E. W. Antimicrobial properties of lactoferrin. **Biochimie** 91(1):19-29, 2009.

Kadioglu, A.; *et al.* The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nature Reviews Microbiology**, 06(4):288-301, 2008.

Kaijalainen T.; *et al.* Invasive infections caused by *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* among children in St Petersburg, Russia. **Clin Microbiol Infect.** 14(5):507-10, 2008.

Kirkpatrick, C. H. Inhibition of growth of *Candida albicans* by iron-unsaturated lactoferrin: relation to host-defense mechanisms in chronic mucocutaneous candidiasis. **J Infect Dis.**, 124(6):539–44, 1971.

Legrand, D.; *et al.* Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. **Cell Mol Life Sci.**, 62(22): 2549-2559, 2005.

- Levay, P. F.; Viljoen, M. Lactoferrin: a general review. **Haematological**, 80(3):252-267, 1995.
- Ling, J. M.; Schryvers, A. B. Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. **Biochem Cell Biol.** 84:275-81, 2006.
- Liñares, J.; *et al.* Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. **Clin Microbiol Infect.**, 16(5):402-10, 2010.
- McCool, T. L.; *et al.*, 2003. The Immune Response to Pneumococcal Proteins during Experimental Human Carriage. **Brief Definitive Report**, 195(3):359-365, 2002.
- Malley, R. Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. **J Mol Med.**, 88(2):135-42, 2010.
- Marchetti, M.; *et al.* Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese-, and zinc-saturated lactoferrin. **Med Microbiol Immunol**, (4):199–204, 1999.
- Marriott, H. M.; Dockrell, D. H. *Streptococcus pneumoniae*: the role of apoptosis in host defense and pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol.**, 38(11):1848-54, 2006.
- McDaniel L, S. *et al.* Localization of protection eliciting epitopes on PspA of *S. pneumoniae* between amino acid residues 192 and 260. **Microb. Pathog.** 17:323-337, 1994.
- Ministério da Saúde, 2010 A. Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/intro_pneumococica10_val_04_02_10_ver_final.pdf.
- Ministério da Saúde, 2009 – B. Sistema de Informação Hospitalares Do SUS. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>. Acesso em: 20/06/2010.
- Ministério da Saúde, 2010 - C. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=1450&CO_NOTICIA=11080. Acesso em: 28/08/2010.

Ministério da Saúde, 2010 - D. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/calendario_indigena_250510.pdf>. Acesso em: 28/08/2010.

Miyaji, E.N.; *et al.* Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. **Infect. Immun.**, 70(9):5086-90, 2002.

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.**17(3):439-46, 2010.

Novak, R.; *et al.* Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. **Nature**, 399(6736):590–3, 1999.

Ochs, M. M.; et al. Vaccine-induced human antibodies to PspA augment complement C3 depositio on *S. pneumoniae*. **Microbial Pathogens.**44: 204–214, 2008.

Ogunniyi, A. D.; *et al.* Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. **Infect Immun.**, 75(4):1843-51, 2007.

Organização Mundial da Saúde. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. **Weekly epidemiological record**, 82(12):93-104, 2007.

Organização Mundial de Saúde. Pneumococcal Vaccines. **Weekly Epidemiological Record**,78(14):97-120, 2003.

Orsi, N. The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. **Biometals**, 17(3): 189-196, 2004.

Payne, D.B.; *et al.* PspA family typing and PCR-based DNA fingerprinting with BOX A1R primer of pneumococci from the blood of patients in the USA with and without sickle cell disease. **Epidemiol.Infect.**,133(1):173-8, 2005.

- Pimenta, F.C.; *et al.* Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during an ongoing surveillance study of children in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**,44(8):2838-43, 2006.
- Pletz, M.W.; *et al.* Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 32(3):199-206, 2008.
- Ren, B.;*et al.* Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface.**Infect Immun.**, 72(1):114-122, 2004.
- Reyes, R.E.; *et al.* El hierro and la virulencia bacteriana.**Inf Microbiol.** 25:104–7, 2005.
- Sallmann, F. R.; *et al.* Porins OmpC and PhoE of Escherichiacoli as specific cell surface targets of human lactoferrin. Binding characteristics and biological properties.**J Biol Chem.**, 274(23):16107-14, 1999.
- Schaible, U. E.; *et al.* Correction of the iron overload defect in beta-2-microglobulin knockout mice by lactoferrin abolishes their susceptibility to tuberculosis. **J Exp Med.**, 196(11): 1507-1513, 2002.
- Seganti, L.; *et al.* Antiviral activity of lactoferrin towards naked viruses.**Biometals**, 17(3):295–9, 2004.
- Senkovich, O.; *et al.* Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein A provides insight into microbial defense mechanism. **J Mol Biol.**, 370(4):701-13, 2007.
- Serrano, M. E. D. Actividades antibacterianas de la lactoferrina. **Enf Inf Microbiol.**, 26(2):58-63, 2006.
- Shaper, M.; *et al.*PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. **Infect Immun.**, 72(9):5031-40, 2004.

Sociedade Brasileira de Imunizações, 2008. Doença pneumocócica invasiva (DPI): importância e impacto na saúde. Disponível em: http://www.sbim.org.br/sbim_info_doenca_pneumococica.pdf. Acesso em:28/08/2010.

Superti, F., *et al.* Antiviral activity of Milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. **Med Microbiol Immunol**, 186(2-3):83–91, 1997.

Tai, S. S.; *et al.* Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun.**, 61(12): 5401-05, 1993.

Tai, S. S. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. **Crit Rev Microbiol.**, 32(3):139-53, 2006.

Takakura, N.; *et al.* Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, 47(8):2619–23, 2003.

Taniai, H.; *et al.* Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of *Streptococcus pneumoniae*: Role of lactate as an energy source. **J. Bacteriol.**, 190(10):3572-79, 2008.

Van Der Strate, B. W. A.; *et al.* Antiviral activities of lactoferrin. **Antiviral Res.**, 52(3):225–39, 2001.

Velliyagounder, K.; *et al.* One of two lactoferrin variants exhibits increased antibacterial and transcriptional activation activities and is associated with localized juvenile periodontitis. **Infect Immun** 2003, 71(11): 6141-47.

Ventura, C. L.; *et al.* Control of capsular polysaccharide chain length by UDP-sugar substrate concentrations in *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol.**, 61(3):723-33, 2006.

Viani, R. M.; *et al.* Lactoferrin inhibits HIV-1 replication in vitro and exhibits synergy when combined with zidovudine. **AIDS**, 13(10):1273–4, 1999.

Vorland, L. H. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. **APMIS**, 107(11):971-981, 1999.

Zarembek, K. A.; *et al.* Human polymorphonuclear leukocytes inhibit *Aspergillus fumigatus* conidial growth by lactoferrin-mediated iron depletion. **J Immunol**, 178(10):6367–73, 2007.

Yother, J. Capsules. In: Tuomanen E, I *et al.* The Pneumococcus. Washington, D. C.: **ASM Press**, 2004:3048.

Yother, J.; White, J.M. Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. **J. Bacteriol.**, 176(10):2976-85, 1994.

Wysocki, J.; *et al.* Immunogenicity of the 10-valent pneumococcal non-typeable *Haemophilus influenzae* protein D conjugate vaccine (PHiD-CV) when coadministered with different *Neisseria meningitidis* serogroup C conjugate vaccines. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, 28(4):77-88, 2009.

ANEXO I

Espectro de ação anti-microbiana da lactoferrina.

	Alvo	Modo de Ação
Bactérias Gram-Positivas	<i>Streptococcus mutans</i>	Interação independente de Ferro com a célula bacteriana.
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Interação com o Ácido Lipotécico na superfície bacteriana.
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Impede a formação do biofilme através de sequestro de Ferro.
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Aumenta fagocitose da bactéria <i>in vitro</i>
	<i>Clostridium sp.</i>	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	
	<i>Micrococcus sp.</i>	
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	
	<i>Bacillus subtilis</i>	
Bactérias Gram-Negativas		
	<i>Chlamydomphila psittaci</i>	
	<i>Helicobacter felis</i>	
	<i>Helicobacter pylori</i>	
	<i>Legionella pneumophila</i>	
	<i>Vibrio cholerae</i>	
	<i>Haemophilus influenza</i>	Altera a virulência bacteriana, degradando IgA1 e Hap.
	<i>Shigella flexneri</i>	Destrói o sistema secretor do tipo III bacteriano, degradando IpaB e IpaC.
	<i>Escherichia coli</i>	Destrói o sistema secretor do tipo III bacteriano, degradando EspA, EspB e

		EspC; altera permeabilidade da membrana e libera LPS.
	<i>Salmonella typhimurium</i>	Interação com a superfície bacteriana, altera permeabilidade da membrana e libera LPS.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Evita a formação de biofilme provavelmente através do seqüestro de Ferro.
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Evita a formação de biofilme provavelmente através do seqüestro de Ferro.
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Evita a formação de biofilme provavelmente através do seqüestro de Ferro.
Outras bactérias		
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
Vírus Envelopados	Vírus Herpes Simples	Tem como alvo a adsorção/entrada- resultados contraditórios se há efeito direto na partícula viral ou não.
	Citomegalovírus	Tem como alvo a adsorção/entrada- sem efeito na partícula viral.
	Vesicular stomatitis vírus	Alta regulação da expressão de interferon α/β dos macrófagos.
	Hepatite B	Tem como alvo moléculas celulares- interferindo na adesão/entrada.
	Hepatite C	Tem como alvo o envelope protéico E1 e E2- bloqueia entrada.
	Hepatite G	Desconhecido.
	Vírus humano da	Tem como alvo a alça V3 da proteína

	imunodeficiência	gp120 do envelope- bloqueia a adesão a CXCR4 ou CCR5.
	Vírus do Herpes felino tipo 1	Tem como alvo à adesão/entrada.
	Vírus Sindbis	Tem como alvo a adsorção/entrada- sem efeito na partícula viral.
	Vírus da floresta Selmiki	Tem como alvo a adsorção/entrada- sem efeito na partícula viral.
	Vírus respiratório sincicial	Desconhecido.
	Hantavírus	Tem como alvo adsorção/entrada (não sulfato de heparan)- sem efeito na partícula viral.
Vírus Não-Envelopados	Rotavírus	Interação viral- impede a hemaglutinação e adesão a receptores celulares.
	Poliovírus	Tem como alvo adsorção viral/compete pela interação com receptor viral.
	Adenovírus	Tem como alvo adsorção viral/ liga-se à proteína viral III e IIIa.
	Enterovírus (EV71 e Echovirus 6)	Tem como alvo adsorção viral- liga-se a receptores celulares e à proteína VP1 da superfície viral. Inibe apoptose.
Fungos e Leveduras	<i>Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei, Candida guilliermondii, Candida parapsilosis, Candida glabrata</i>	Perturbação da parede celular
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Seqüestro de Ferro.

Parasitas e outros Microorganismos Eucarióticos	<i>Plasmodium berghei</i>	Tem como alvo a entrada da célula hospedeira.
	<i>Pneumocystis carinii</i>	Sequestro de Ferro.
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Provavelmente ligado ao seqüestro de Ferro.
	<i>Babesia caballi</i>	Sequestro de Ferro.

Adaptado de Jenssen e Hancock (2009) e Gonzalez-Chavez *et al.*, (2009).

ANEXO II



UNIVERSIDADE
SÃO FRANCISCO

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

Bragança Paulista, 18 de Março de 2009.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto de Pesquisa: Vacinas anti- pneumocócicas baseadas em PspA, Ply e OS: Mecanismos de resposta imunológica e proteção contra sepse em camundongo.

Curso: Medicina

Autor(es): Prof. Dra. Michelle Bertoncini

Instituição: UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Prezado(a)s Pesquisador(a)s,

O Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Universidade São Francisco, analisou expressamente no dia **17/03/2009** o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

Parecer: Aprovado

Atenciosamente,

Maria Betânia de Oliveira Garcia
Vice - Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - USF
Universidade São Francisco

CÂMPUS DE BRAGANÇA PAULISTA Av. São Francisco de Assis, 218 - CEP 12916-900 Fone (11) 4034-8000 - FAX (11) 4034-1825
CÂMPUS DE CAMPINAS Rua Waldemar César da Silveira, 105 - Cura D'Arns CEP 13045-270 (19) 3779-3300
CÂMPUS DE ITATIBA Rua Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - CEP 13251-900 Fone (11) 4534-8000 - FAX (11) 4524-1933
CÂMPUS DO PARI - SÃO PAULO Rua Hannemann, 352 - Pari - CEP 03031-040 Fone (11) 3315-2000 - FAX (11) 3315-2036