

WALTER RODRIGO POLITANO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA
PROTEÍNAS PNEUMOCÓCICAS HÍBRIDAS PspA-
PNEUMOLISINA EM CAMUNDONGOS**

BRAGANÇA PAULISTA-SP

2012

WALTER RODRIGO POLITANO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA
PROTEÍNAS PNEUMOCÓCICAS HÍBRIDAS PspA-
PNEUMOLISINA EM CAMUNDONGOS**

**ORIENTADORA: Prof^a. Dra. MICHELLE DARRIEUX SAMPAIO
BERTONCINI**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação *stricto sensu* em Ciências da
Saúde da Universidade São Francisco (USF)
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

BRAGANÇA PAULISTA-SP

2012

WC 217 Politano, Walter Rodrigo.
P829a Avaliação da produção de anticorpos contra proteínas pneumocócicas híbridas PspA-pneumolisina em camundongos / Walter Rodrigo Politano. -- Bragança Paulista, 2012.
56 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. Proteínas.
3. Anticorpos. 4. Camundongos. I. Bertoncini, Michelle Darrieux Sampaio. II. Título.


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



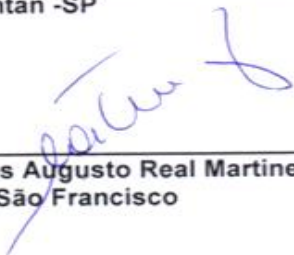
POLITANO, Walter Rodrigo. " Avaliação da produção de anticorpos contra proteínas Pneumocóccicas Híbridas PspA-Pneumolisina em Camundongos ". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em quatorze de Fevereiro de 2012 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



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



Profa. Dra. Giovana Barazzone - Examinadora
Instituto Butantan -SP



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
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

A minha família, que com a paciência dos sábios, cederam preciosas horas de convívio para que este texto pudesse ser escrito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de modo generoso, colocaram à minha disposição os seus conhecimentos e o seu tempo; devo-lhes, ideias e retificações valiosas.

Desde as inquietações iniciais, minha orientadora Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini, acompanhou o desenvolvimento do projeto, e a ela dedico um agradecimento muito especial, por seu estímulo nos momentos de angústia, e pela orientação sensível e serena, por dizer “Não, Walter” e contribuir em todas as etapas para um novo pensar.

Um enorme “Obrigado” aos professores Lúcio Fábio Caldas Ferraz, Giovana Tofoli, Alessandra Gambero, Carlos Augusto Real Martinez, Marcelo Lima Ribeiro, Patrícia de Oliveira Carvalho, Denise Gonçalves Priolli e a todo mundo do maravilhoso mestrado em Ciências da Saúde: Thaís, Laércio, Leonardo, Tarcia, Ana Érica, Cosme, Maria Elisa, Juliana, Juliano, Fabiano, Rita, Vilma ... Sem vocês este trabalho não teria acontecido.

Agradeço aos que conciliaram seu escasso tempo e trouxeram elementos enriquecedores para o estudo, em especial, Cibelly Goulart, Thais Raquel, Dunia Rodrigues, do instituto Butantan.

Agradeço a todos os meus familiares, minha mãe Fátima, que suportaram minha ausência, à companheira e noiva Naflávia, que procurou compreender minhas aflições e o tempo em que me dediquei à minha dissertação.

A todos meu sincero respeito e reconhecimento. Muito obrigado!

*“E o que foi feito é
preciso conhecer, para
melhor prosseguir”.*

Luiz Gonzaga Júnior.

RESUMO

Introdução: *Streptococcus pneumoniae* é um importante agente causador de pneumonia, meningite e septicemia. Elevadas taxas de mortalidade e morbidade das infecções pneumocócicas, aliadas ao surgimento e à disseminação de cepas resistentes aos antibióticos e às perdas econômicas e sociais, fazem com que as pesquisas sobre novas vacinas para prevenção das infecções por *S. pneumoniae* sejam atualmente, consideradas uma prioridade no mundo todo. Uma alternativa para as vacinas de polissacarídeos são as proteínas pneumocócicas.

Objetivo: Avaliar o potencial imunogênico de formulações contendo o fragmento de PspA, e dois mutantes detoxificados da pneumolisina.

Métodos: Estes mutantes foram fusionados geneticamente aos fragmentos codificante da porção N-terminal de PspA 245 (clado 1), produzindo duas proteínas híbridas, 245-PdD39 e 245-Pd472. Os mutantes e híbridos foram avaliados quanto à indução de anticorpos em camundongos.

Resultados e Conclusão: Os híbridos promoveram a indução de elevados níveis de anticorpos em camundongos. Em alguns casos, as vacinas híbridas mostraram-se superiores às proteínas co-administradas, sugerindo um possível efeito sinérgico. A razão IgG1/IgG2a dos anticorpos induzidos pelas imunizações foi equilibrada, sugerindo que a produção anticorpos foram capazes de agir sinérgicamente na promoção da opsonização e reforçar o sistema complemento. Assim os resultados sugerem que vacinas híbridas contendo PspA e mutantes detoxificados de pneumolisina representam uma estratégia vacinal promissora, capaz de induzir a produção de elevados níveis de anticorpos contra os dois componentes vacinais e proporcionar uma imunização equilibrada capaz de agir sinérgicamente na promoção da opsonização e, conseqüentemente, da eliminação da bactéria pelo sistema imune.

Palavras Chaves: *Streptococcus pneumoniae*, proteínas e anticorpos.

ABSTRACT

Introduction: *Streptococcus pneumoniae* is an important agent of pneumonia, meningitis and septicemia. High rates of morbidity and mortality of pneumococcal infections, combined with the emergence and spread of antibiotic-resistant strains and the social and economic losses, make research on new vaccines for the prevention of infections caused by *S. pneumoniae* is currently considered a priority worldwide. An alternative to polysaccharide vaccines are pneumococcal proteins.

Objectives: To evaluate the immunogenic potential of formulations containing the fragment of PspA, and two mutants of detoxified pneumolysin.

Methods: These mutants were genetically fused to the fragments encoding the N-terminal portion of PspA 245 (clade 1), producing two hybrid proteins, 245-PdD39 and 245-Pd472. Mutants and hybrids were evaluated for antibody induction in mice.

Results and Conclusions: Hybrids promoted induction of high levels of antibodies in mice. In some cases, the vaccines proved superior hybrid protein co-administered, indicating a possible synergistic effect. The reason IgG1/IgG2a antibodies induced by immunization was equilibrated, suggesting that production antibodies were able to act synergistically in the promotion of opsonization and enhance the complement system. Thus the results suggest that vaccines containing hybrid of PspA and mutant detoxified pneumolysin represent a promising strategy vaccine capable of inducing the production of high levels of antibodies against both vaccine components and to provide a balanced immunization can act synergistically to promote opsonization and consequently the elimination of the bacteria by the immune system.

Key-Words: *Streptococcus pneumoniae*, proteins and antibodies.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	Arginina
Asp	Ácido Aspártico
Asn	Asparagina
BSA	Albumina Bovina Sérica
C3b	Proteína do Sistema Complemento
CDC	Citolisina
CDR	Região Definidora de Clado
ChoP	Fosfocolina
CPS	Cápsula Polissacarídica
Cys	Cisteína
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
DPI	Doença Pneumocócica Invasiva
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
Gly	Glicina
His	Histidina
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G Subclasse 1
IgG2a	Imunoglobulina G Subclasse 2a
IgG2b	Imunoglobulina G Subclasse 2b

IgG3	Imunoglobulina G Subclasse 3
IgG4	Imunoglobulina G Subclasse 4
IL-1 β	Interleucina 1 β
KDa	Quilodálon
KO	Knock-out
LtyA	Autolisina
NO	Óxido Nitroso
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Orto-fenilenodiamina
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PBS-T	Tampão Fosfato-Salino acrescido de Tween 20 a 0,05%
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogênico
Pd	Pneumolisina detoxificada
PdA	Pneumolisina detoxificada com uma mutação
PdB	Pneumolisina detoxificada com duas mutações
PdT	Pneumolisina detoxificada com três mutações
pIgR	Receptor polimérico de Imunoglobulina
PspA	Proteína A de Superfície Pneumocócica
PspC	Proteína C de Superfície Pneumocócica
Phe	Fenilalanina
Ply	Pneumolisina
PNI	Programa Nacional de Imunização

PS	Polissacarídeo Capsular
TLR	Receptor de Complemento
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Trp	Triptofano

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Quadro de classificação dos clados e famílias de PspA segundo o grau de identidade.....	20
Figura 02 – Representação em fita da estrutura da pneumolisina, contendo quatro domínios enumerados.....	22
Figura 03 – Posições de domínio é mostrado no monômero (a), em comparação com o anel isolado (conformação subunidade montado a estrutura helicoidal (b) e para o oligômero ligado a membrana (c).....	23
Figura 04 – Esquema da sequência de imunização pela via subcutânea e consecutivas coletas através da sangria por punção retro orbital.....	28
Figura 05 – Análise da produção de anticorpos IgG contra rPspA, Pd472 e PdD39 após uma, duas e três imunizações.....	31
Figura 06 – Análise da produção de anticorpos IgG contra o pneumolisóide Pd472, PdD39 e rPspA, após uma, duas e três imunizações com os antígenos combinados.....	33
Figura 07 – Análise da produção de anticorpos IgG contra o pneumolisóide Pd472, PdD39 e rPspA, após uma, duas e três imunizações com as proteínas híbridas.....	34
Figura 08 – Análise da reatividade cruzada dos anticorpos com Pd472 e PdD39.....	35
Figura 09 – Análise da produção de anticorpos IgG contra rPspA após três imunizações.....	36
Figura 10 – Análise da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a contra os pneumolisóides PdD39 (a) e Pd472 (b).....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Histórico.....	15
1.2 Características do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	17
1.3 Fatores de virulência.....	18
1.4 PspA e Pneumolisina como candidatos vacinais contra <i>S. pneumoniae</i>	19
2. OBJETIVOS.....	26
3. METODOLOGIA.....	27
3.1 Aspectos éticos.....	27
3.2 Proteínas recombinantes.....	27
3.3 Esquema de imunização.....	28
3.4 Avaliação da produção de anticorpos	28
3.5 Determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a.....	29
3.6 Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS	31
4.1 Efeito de imunizações consecutivas sobre a produção de anticorpos	31
4.2 Reatividade cruzada entre os anticorpos anti-Pd.....	34
4.3 Reatividade dos anticorpos contra a proteína PspA recombinante	35
4.4 Isotipagem de anticorpos anti-IgG1 e IgG2a de camundongos	36
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO.....	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

O *Streptococcus pneumoniae* é um importante patógeno humano, causador de otite média, pneumonia, sepse e meningite. Os idosos, as crianças menores de dois anos de idade, e os indivíduos imunodeprimidos são particularmente suscetíveis às doenças pneumocócicas (Paton *et al.*, 1991; McCullers e Tuomanen, 2001).

A capacidade de colonizar, invadir e danificar tecidos do hospedeiro é atribuída aos fatores de virulência, que incluem proteínas, lipoproteínas e polissacarídeos (Watson *et al.*, 1995; Mitchell e Andrew, 1997). O pneumococo coloniza o trato respiratório superior dos seres humanos e pode ser isolado da nasofaringe de até um quarto dos adultos saudáveis e 80% das crianças menores de cinco anos de idade (Austrian, 1989).

Apesar dos elevados níveis de colonização por pneumococo na população, a frequência de doença pneumocócica é bastante diminuída em pessoas saudáveis, considerados portadores assintomáticos. As superfícies epiteliais do organismo atuam como uma barreira efetiva contra a maioria dos microrganismos e são rapidamente reparadas se houver um dano. Além disso, o microorganismo que consegue atravessar as superfícies epiteliais pode ser eficientemente removido pelos mecanismos da imunidade inata que atuam nos tecidos. Na maioria dos casos, essas defesas impedem que a infecção seja estabelecida (Brandileone *et al.*, 2004; Janeway, 2007).

A doença pneumocócica é sempre precedida pela colonização, e decorre da invasão de sítios estéreis pelas bactérias. A pneumonia resulta da aspiração de bactérias da nasofaringe para os pulmões, seguida por intensa reação inflamatória local, que pode ser fatal. A sepse desenvolve em cerca de 10-15% dos casos de pneumonia pneumocócica. Os componentes da superfície bacteriana desempenham um importante papel no início da infecção, por inibirem o sistema complemento e a fagocitose (Baltimore e Shapiro, 1991; Watson *et al.*, 1995).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 1,6 milhões de pessoas morrem todo o ano no mundo devido a doenças pneumocócicas, sendo que destas, em torno de 1 milhão são crianças com menos de 5 anos, e a maioria dos casos ocorre em países em desenvolvimento (OMS, 2007).

Estas elevadas taxas de mortalidade e morbidade das infecções pneumocócicas, aliadas ao surgimento e à disseminação de cepas resistentes aos antibióticos e às perdas econômicas e

sociais, fazem com que as pesquisas sobre novas vacinas para prevenção das infecções por *S. pneumoniae* sejam atualmente, consideradas uma prioridade no mundo todo (CDC, 2007; Braido *et al.*, 2008).

Uma alternativa para as vacinas de polissacarídeos são as proteínas pneumocócicas (Paton, 1998). As mais promissoras até o momento para este fim são: a Proteína A de Superfície Pneumocócica (PspA), a Proteína C de superfície pneumocócica (PspC) e a pneumolisina (Ply) (Ogunniyi *et al.*, 2007).

1.1 Histórico

Streptococcus pneumoniae foi descrito, pela primeira vez em 1875 por Edwin Klebs, ao observar o fluido dos pulmões de um homem com pneumonia. Em 1880 o agente foi igualmente descrito por Karl Eberth, ao examinar os exsudatos do pulmão e do espaço subaracnóide de um homem com pneumonia e meningite secundária. No mesmo ano, M. Mátray descreveu e denominou *Pneumoniae kokken* os cocos que observou tanto no escarro de pacientes com pneumonia quanto no de pessoas saudáveis (White, 1938; Finland, 1982).

No entanto, o mérito da descoberta de *S. pneumoniae* coube a Louis Pasteur e George Sternberg, que em 1881, de forma independente, isolaram o agente através da cultura em animais. Pasteur, na França, denominou o agente *Microbe septicémique du saliva*. Sternberg, nos EUA, também isolou o agente em coelhos, após inoculá-los com a própria saliva. Em 1885, denominou o agente de *Micrococcus pasteurii*, em homenagem ao cientista francês (White, 1938; Finland, 1982).

Contudo, a associação entre o agente e a pneumonia lobar só foi efetivamente estabelecida em 1883, tanto por Talamon, que o denominou *Coccus lancéolé de la pneumonie*, quanto por Friedlander, que o denominou *Pneumonie mikrokokken*. Estes autores conseguiram reproduzir a doença pulmonar em animais após a inoculação da bactéria, obtida através da cultura de espécimes clínicos de pacientes com pneumonia (White, 1938; CDC, 2007).

Através da reação de aglutinação, Lister, em 1913, na África do Sul, e Dochez e Gillespie, nos EUA, começaram a classificar os pneumococos em tipos específicos. Nas duas primeiras décadas do século XX, uma mistura de vários tipos de pneumococos viáveis e inativados foram

utilizadas para vacinação de mineradores de ouro e diamante na África do Sul, com resultados parcialmente eficazes neste grupo altamente susceptível à pneumonia pneumocócica (Finland, 1982; Musher, 2005).

Em 1920, Heidelberger e Avery demonstraram que os anticorpos que conferiam proteção contra o pneumococo reagem com polissacarídeos capsulares do agente. Adicionalmente, foi desenvolvido o uso da aglutinação para determinação do sorotipo causador da doença em determinado paciente, assim como anti-soros específicos para o tratamento. A partir de 1931 o teste de Quellung passou a ser usado para a sorotipagem rápida do pneumococo, em substituição à aglutinação, e em 1932 já eram conhecidos cerca de 30 dos 92 sorotipos de *S. pneumoniae* conhecidos atualmente (Finland, 1982; Musher, 2005; Malley, 2009).

Felton (1930) preparou pela primeira vez polissacarídeos capsulares purificados com o intuito de imunizar humanos, e em 1938 o polissacarídeo purificado do tipo I foi utilizado para combater uma epidemia de pneumonia em um hospital de Massachusetts, EUA (Musher, 2005).

Estudos epidemiológicos demonstraram que no Brasil, entre 1977-2000, os sorotipos frequentemente 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, 2003; Yoshioka *et al.*, 2011).

Uma vacina contendo polissacarídeos, de 14 sorotipos foi produzida e licenciada nos EUA em 1977, tendo sido posteriormente substituída por uma formulação 23-valente, utilizada até os dias atuais na imunização de adultos. Em 2000, foi lançada a primeira vacina anti-pneumocócica conjugada, contendo polissacarídeo Capsular (PS) de 7 sorotipos prevalentes fusionados ao toxóide diftérico. Atualmente, formulações contendo 10 polissacarídeos conjugados já estão disponíveis e passaram a fazer parte do Calendário Básico de Vacinação do Programa Nacional de Imunização (PNI) a partir de março de 2010 (Ministério da Saúde, 2010 – C, D). Outra vacina contém 13 sorotipos conjugadas à proteína diftérica CRM-197. Estima-se que os três sorotipos adicionais aos 10 incluídos na vacina 10 valente, (3, 6A e 19A) aumentem para 92% a cobertura da vacina para prevenção de Doença Pneumocócica Invasiva (DPI) em lactentes e crianças pequenas no mundo todo. No Brasil, essa vacina representaria a possibilidade de prevenção de 87% dos casos de DPI em crianças com menos de 5 anos de idade.

O descobrimento da penicilina, utilizada na prática clínica a partir de 1943, mudou a história natural da doença pneumocócica. No entanto, a resistência a essa droga passou a ser

relatada na literatura a partir de 1967, constituindo-se, especialmente a partir dos anos 90, em grave problema de saúde pública (Crook e Spratt, 1998; Tavares, 2001; Low, 2005).

O número de cepas de pneumococo resistentes a antibióticos tem aumentado de forma alarmante nas últimas décadas (Brandileone *et al.*, 2006), reforçando a necessidade de se ampliar as estratégias de prevenção destas doenças.

1.2 Características do *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae é um diplococo gram-positivo encapsulado, α -hemolítico e catalase-negativo (Marriott e Dockrell, 2006). É uma bactéria extracelular, capaz de se replicar na circulação, nos tecidos conjuntivos e em espaços teciduais, tais como os lumens das vias aéreas.

A superfície do pneumococo é constituída de três estruturas: a membrana plasmática, que exhibe uma estrutura conservada, com moléculas de ácido lipoteicóico – contendo resíduos de fosfocolina (ChoP); a parede celular composta de polissacarídeos e ácido teicóico, que ancora diversas proteínas de superfície; a cápsula polissacarídica, que possui entre 200-400 nm de espessura (Dawson, 2004; Kadioglu *et al.*, 2008).

A estrutura química variável do polissacarídeo capsular permite até o momento a sua classificação em 92 sorotipos (Braido *et al.*, 2008; Pletz *et al.*, 2008; Malley, 2009). Destes, um pequeno número predomina como agentes causadores de doença no homem; estima-se que 11 sorotipos sejam responsáveis por 75% das infecções pneumocócicas em todo o mundo, sendo a maioria apenas colonizante (Dawson, 2004).

1.3 Fatores de virulência

A virulência do pneumococo está associada a duas características importantes: sua capacidade de resistir à fagocitose pelo sistema imune do hospedeiro e a capacidade de colonizá-lo (Rosenow *et al.*, 1997; Bosarge *et al.*, 2001; Thornton e McDaniel, 2005).

A cápsula polissacarídica (CPS) é considerada essencial na resistência ao sistema complemento, e a interação de pneumococos com o complemento varia de acordo com o tipo de cápsula polissacarídica (McDaniel e Swiatlo, 2004; Kerr *et al.*, 2006).

Abaixo da cápsula encontra-se a parede celular rica em ácido teicóico; esta molécula, também conhecida como polissacarídeo C, contém resíduos de colina que são responsáveis pela resposta inflamatória intensa observada na infecção por pneumococo, com ativação do sistema complemento e produção de citocinas (Dawson, 2004).

Além da cápsula, diversas proteínas desempenham papel importante na adesão e na doença invasiva (Watson *et al.*, 1995; Mitchell e Andrew, 1997).

A pneumolisina (Ply) é uma enzima citoplasmática produzida por todos os isolados clínicos de *S. pneumoniae*, que apresenta múltiplas funções: ativa o sistema complemento, estimula a apoptose das células do hospedeiro, atua como citolisina (CDC), ligando-se ao colesterol da membrana plasmática do hospedeiro e formando poros (Price e Camilli, 2009).

A autolisina é uma enzima responsável pela degradação do peptidoglicano de parede celular levando à lise das células bacterianas. A amidase LtyA é uma enzima pertencente ao grupo das autolisinas, que atua direta e indiretamente na patogênese da infecção pneumocócica. O aumento desse componente de parede celular induz intensa atividade inflamatória (Tuomanen, 1999).

A proteína C de superfície pneumocócica (PspC) interage com o fator H (Dave *et al.*, 2004; Quin *et al.*, 2005) uma proteína plasmática reguladora do complemento que liga C3b, e é capaz de competir com o fator B e deslocar Bb da convertase, além de atuar como um cofator para o fator I, na conversão de C3b para iC3b (Janulczyk *et al.*, 2000; Krushkal *et al.*, 2000; Jarva *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004). PspC também atua como adesina, devido à sua capacidade de ligar-se ao receptor polimérico de Imunoglobulina (pIgR), levando à migração do pneumococo através do epitélio da nasofaringe (Zhang *et al.*, 2000).

A proteína de superfície pneumocócica A (PspA) é um fator de virulência exposto, sorologicamente variável e presente em todos isolados de pneumococos, com uma massa molecular que pode variar entre 67 e 99 KDa (Briles *et al.*, 2000b). PspA atua como inibidor da ativação de complemento mediada por fator B *in vivo* (via alternativa) e como inibidor da deposição de C3b e seu processamento (degradação das cadeias α e β) *in vitro* (Ren *et al.*, 2004a).

Os pneumococos também desenvolveram mecanismos de resistência às penicilinas, alterando as transpeptidases existentes na parede celular, sendo que toda a alteração de síntese de proteínas ligadoras de penicilina é mediada cromossomicamente. Essas alterações são decorrentes da substituição de segmentos de cromossomo por fragmentos provenientes de outras espécies de estreptococos, utilizando plasmídeos (Tomaz, 2000).

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

PspA é um fator de virulência exposto, composto por quatro domínios distintos: uma região N-terminal rica em α -hélices e altamente carregada, que compreende a porção funcional de PspA e projeta-se para fora da cápsula; uma região rica em resíduos de prolina; uma região de ligação à colina, responsável pela fixação da proteína à superfície da bactéria, e uma cauda C-terminal hidrofóbica curta (Gor *et al.*, 2005; Jedrzejewski *et al.*, 2001; Briles *et al.*, 2000b).

A região N-terminal, contém a maior parte dos epitopos imunogênicos (McDaniel *et al.*, 2004) e é capaz de proteger camundongos contra o desafio invasivo com pneumococos virulentos (revisado por Tai, 2006). A carga negativa na extremidade N-terminal está implicada na redução de deposição da proteína de complemento C3b na superfície bacteriana, resultando na inibição de opsonofagocitose da bactéria, mediada pela via alternativa do complemento (Ren *et al.*, 2004b; Jarva *et al.*, 2003; Tu *et al.*, 1999).

A região N-terminal foi subdividida nas porções A, A' e B, através de estudos de alinhamento de sequências de PspAs distintas. Dentre estas, a região B, também conhecida como “região definidora de clado” (CDR), apresentou padrão de variação mais previsível, servindo como base para a classificação de PspA em 3 famílias, subdivididas em 6 clados, de acordo com o grau de identidade, conforme a figura 01.

Família 1		Família 2			Família 3
Clado 1	Clado 2	Clado 3	Clado 4	Clado 5	Clado 6

Figura 01: Quadro de classificação dos clados e famílias de PspA segundo o grau de identidade (Hollingshead *et al.*, 2000).

Entre famílias, a diferença de identidade nesta região é superior a 45%, e entre clados, 20% (Hollingshead *et al.*, 2000). As PspAs de famílias 1 e 2, especialmente os clados 1 a 4, são predominantes em todo o mundo (Vela *et al.*, 2001; Mollerach *et al.*, 2004; Beall *et al.*, 2000); no Brasil, estão presentes em 99% dos isolados clínicos (Brandileone *et al.*, 2004; Pimenta *et al.*, 2006).

A principal função de PspA está relacionada à sua capacidade de inibir a deposição de proteínas do complemento na superfície bacteriana, uma característica observada nas moléculas de famílias 1 e 2 (Ren *et al.*, 2003). Estudos utilizando pneumococos PspA negativos demonstraram que esta proteína é importante para a virulência da bactéria, e que a virulência está relacionada à capacidade de interagir com o sistema complemento; enquanto os mutantes PspA-negativos são avirulentos em camundongos selvagens, sua virulência é retomada em animais knock-out (KO) deficientes nos componentes iniciais da cascata do complemento (Ren *et al.*, 2004a).

PspA tem se mostrado imunogênica e protetora em diversos modelos animais (Tai, 2006). Apesar da significativa variação em sua estrutura, a imunização com a porção N-terminal de PspA, das diferentes famílias e clados é capaz de induzir anticorpos com reatividade cruzada (Briles *et al.*, 2000a, Tart *et al.*, 1996; Nabors *et al.*, 2000).

O grau de reatividade cruzada entre PspAs é variável (Nabors *et al.*, 2000). Foi demonstrado que moléculas de PspAs de famílias diferentes induzem anticorpos com capacidades distintas de reconhecimento de moléculas heterólogas (Darrieux *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2010). A variabilidade no reconhecimento também está presente em proteínas do mesmo clado. Um estudo de variabilidade entre PspAs de família 1 identificou dois fragmentos recombinantes, PspA245 e PspA94, capazes de induzir anticorpos com ampla reatividade cruzada dentro desta família (Goulart *et al.*, 2011). No entanto, estas moléculas não foram capazes induzir anticorpos que reconhecessem PspAs de família 2, sugerindo que uma vacina mais abrangente necessitaria conter PspAs de ambas famílias.

Estudos demonstraram que a utilização de vacinas híbridas, contendo PspA das duas famílias predominantes, tanto na forma de DNA como proteína, são capazes de aumentar o espectro de proteção em relação aos fragmentos isolados (Darrieux *et al.*, 2007; Miyaji *et al.*, 2002). Estes resultados sugerem que as proteínas quiméricas constituem uma estratégia vacinal

eficaz, capaz de fornecer cobertura equivalente à de formulações contendo múltiplos antígenos (Ren *et al.*, 2004b).

Humanos naturalmente infectados ou colonizados com *S. pneumoniae* produzem anticorpos anti-PspA que podem ser detectados no soro e nas secreções de mucosa (Briles *et al.*, 2004). Estes dados demonstram que PspA é expressa durante o curso da infecção e é facilmente acessível ao sistema imune (Swiatlo e Ware, 2003). Além de seu potencial protetor comprovado em modelos animais, PspA já foi utilizada com sucesso em um ensaio clínico de fase I (Briles *et al.*, 2000c).

Diferentes estudos sugerem que o papel protetor de PspA enquanto candidato vacinal envolve o bloqueio da inibição sobre o sistema complemento (Yuste *et al.*, 2005); assim, a imunização com PspA resulta na produção de anticorpos capazes de ativar a via clássica, através da porção Fc, e a via alternativa, pela inativação das funções de PspA, levando a um aumento na deposição de C3 na bactéria e “clearance” pelo sistema imune (Ren *et al.*; 2004b, Darrieux *et al.*, 2008; Goulart *et al.*, 2011).

Outro fator de virulência pneumocócico com potencial vacinal é a pneumolisina (Ply), inicialmente descrita como uma proteína citoplasmática liberada pela autólise das células bacterianas sob ação da autolisina (Johnson, 1977; Mitchell *et al.*, 1997). Contrariando esse modelo, Briles e colaboradores mostraram que Ply é liberada em sobrenadantes de cultura *in vitro* mesmo na ausência de LtyA (Balachandran *et al.*, 2001). Um trabalho mais recente utilizando técnicas de fracionamento mostrou que Ply está localizada na parede celular em múltiplos sorotipos de pneumococo (Price e Camilli, 2009); no entanto, o mecanismo de transporte da Ply através da membrana citoplasmática e, subsequente exportação para o meio extracelular ainda não foram esclarecidos.

A Pneumolisina é uma citotoxina ativada por tiol (Berry *et al.*, 1995), que apresenta inúmeros efeitos inflamatórios e intensa atividade hemolítica. Durante a sua conversão a partir de um monômero solúvel nas membranas de células do hospedeiro, a pneumolisina sofre uma série de mudanças estruturais, que levam à formação de um anel com 260 Å de diâmetro, composto por aproximadamente quarenta subunidades do monômero, contendo quatro regiões de domínio, conforme descrito na figura 02 (Tilley *et al.*, 2005).

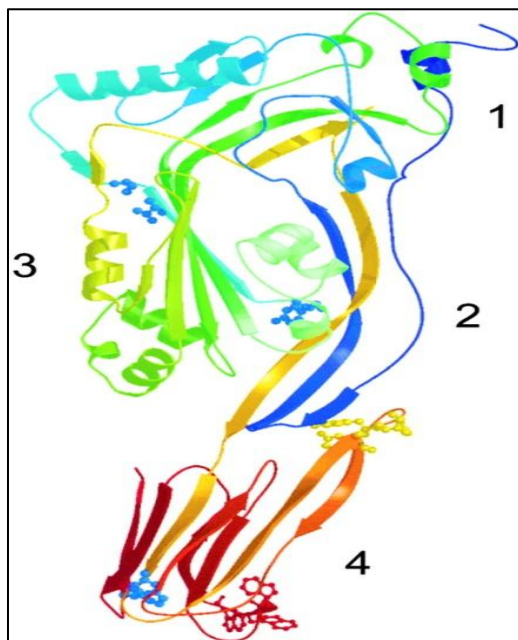


Figura 02 - Representação em fita da estrutura da pneumolisina, contendo quatro domínios enumerados. As três hélices pequenas (verde claro) no domínio 3, junto ao domínio 2, dobram-se para formar a estrutura em grampo β na membrana durante a formação de poros (Shepard *et al.*, 1998). A estrutura em azul na forma de círculo no domínio 4 auxilia a formação dos poros; em vermelho no domínio 4 está representada a estrutura responsável por ligar-se ao colesterol da membrana; em amarelo também no domínio 4 é responsável pela ativação do complemento (Gilbert *et al.*, 1999).

A pneumolisina reconhece e liga-se ao colesterol presente nas membranas de células eucarióticas, pela interação do domínio 4 da proteína, onde sofre oligomerização, como mostrado na figura 03; uma vez inserida na membrana celular, os domínios 2 e 3 sofrem uma transformação conformacional formando poros que levam à lise celular (Bhakdi *et al.*, 1988; Rossjohn *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1998).

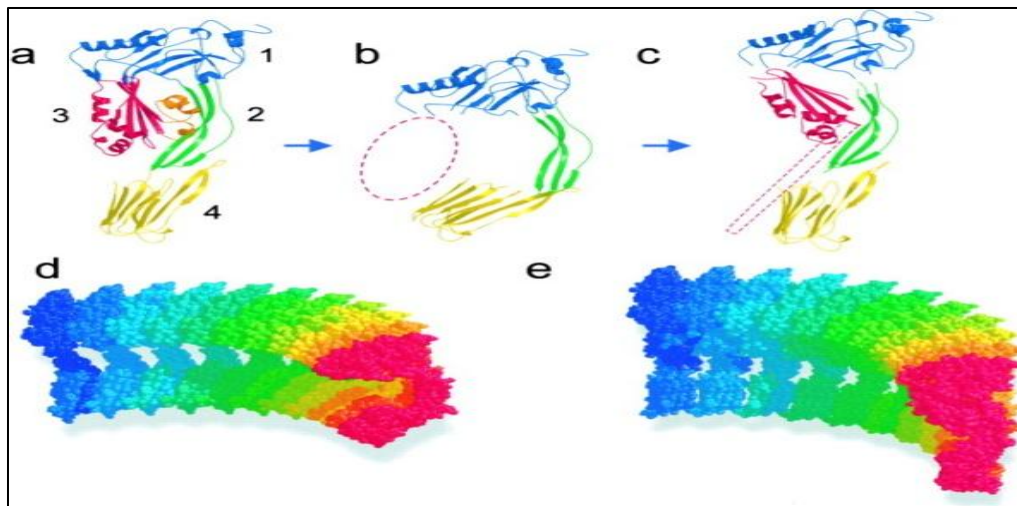


Figura 03 - Posições de domínio é mostrada no monômero solúvel (a), em comparação com o anel isolado (conformação subunidade montado a estrutura helicoidal [b]) e para o oligômero ligado à membrana (c). Os domínios são numerados e coloridos como na Figura 01. A posição de domínio 3 em (b) é esquematicamente indicado pelo contorno tracejado, como é a mudança conformacional (c). Modelos parciais oligômero são mostrados no espaço de enchimento formato livres (d) e ligado (e) anéis (Gilbert *et al.*, 1999).

Estes aglomerados causam poros na membrana que levam à lise celular, causando intensa reação inflamatória. Dessa forma, os oligômeros são considerados os responsáveis pela atividade citolítica da toxina e também pelas atividades imunomodulatórias (Hirst *et al.*, 2004; Kadioglu *et al.*, 2004).

A análise da pneumolisina evidenciou que no domínio 4 da região C terminal da toxina (aminoácidos [aa] 427-437), que inclui o resíduo de cisteína – [aa] 428 é fundamental para a citotoxicidade. Por este motivo a cisteína é conservada entre outros membros da família de citotoxinas ativadas por tiol. A substituição de um único aminoácido nesta região pode reduzir a toxicidade em até 99,9% (Boulnois *et al.*, 1991; Saunders *et al.*, 1989).

Ply também interfere nas funções específicas do sistema imunológico, inibindo a atividade bactericida de neutrófilos, o “burst” respiratório em leucócitos polimorfonucleares (com liberação de TNF- α e NO), a proliferação de linfócitos, e a síntese de anticorpos (Johnston *et al.*, 1981; Paton *et al.*, 1983). Pode aumentar o processo inflamatório pela ativação de complemento, pela ruptura do epitélio e pela estimulação da produção de citocinas (TNF e IL-1 β) (De Velasco *et al.*, 1995).

A pneumolisina é capaz de ativar diretamente a via clássica do Sistema Complemento na ausência de anticorpos específicos (figura 02), interagindo com C1q, devido à sua similaridade com a proteína C reativa. Outra ação simultânea da pneumolisina é a redução da atividade opsonizante do soro, devido à sua habilidade de ligar-se à porção Fc da imunoglobulina G humana (Paton *et al.*, 1984; Mitchell *et al.*, 1991; Rossjohn *et al.*, 1998).

A especificidade do sítio ativo da pneumolisina na interação com a imunoglobulina G é evidenciada quando há uma mutação neste domínio (Asp385 → Asn), que inibe a interação com IgG e suprime a ativação do complemento (Mitchell *et al.*, 1991).

Estudos têm demonstrado que a Ply é reconhecida pelo sistema imunológico através de uma interação específica com TLR4, e está envolvida diretamente na resposta imune inata desencadeada pelo pneumococo (Malley *et al.*, 2003; Bernatoniene *et al.*, 2008). Esta característica confere à Ply um potencial para atuar como adjuvante, permitindo o direcionamento de resposta adaptativa pela interação com componentes específicos da imunidade inata.

Devido à elevada toxicidade da Ply na forma nativa, sua utilização como componente vacinal deve necessariamente incluir a produção de formas detoxificadas, que mantenham as características imunogênicas, sem causar a lise celular. Diversas moléculas detoxificadas, produzidas por métodos químicos ou por mutagênese sítio dirigida, foram geradas e avaliadas quanto à imunogenicidade e toxicidade, com resultados variáveis (Berry *et al.*, 1995).

Em geral, a presença de um maior número de mutações reduz o potencial tóxico, com concomitante redução na imunogenicidade. Uma proteína contendo apenas a mutação Trp-433-Phe manteve 0,1% da propriedade citotóxica (Berry *et al.*, 1995), enquanto uma ply carregando a mutação Asp-385-Asn aboliu a atividade de ativação de complemento, conforme descrito Mitchell *et al.*, (1991)

Uma mutação Cys-428 por Gly foi descrita como PdA (Paton *et al.*, 1991); um mutante duplo, denominado PdB, contendo uma substituição de Cys para Gly na posição 428 e outra de Trp para Phe na posição 433, apresentou 0,001% da atividade hemolítica da proteína nativa (Saunders *et al.*, 1989); finalmente, um mutante triplo, o PdT incluindo as duas mutações citadas anteriormente mais a troca de uma Asp para Asn na posição 385, apresentou inativação completa das propriedades citolítica e de ativação de complemento (Berry *et al.*, 1995).

Embora a mutação Asp385 → Asn no PdT reduza a propriedade de ativação do complemento de pneumolisina para níveis indetectáveis, a capacidade de ligar à região Fc de IgG

não é completamente extinta (Mitchell *et al.*, 1991). Porém, a imunização com PdB induz níveis significativamente mais elevados de anticorpos do que PdT, o que sugere que a manutenção de uma maior atividade citotóxica residual pode ser importante para a resposta imune induzida por pneumolisóides (Ferreira *et al.*, 2006).

Paton *et al.* (1991) relatou diferenças na imunidade protetora de pneumolisóides, mostrando que imunização com o toxóide PdB (Trp-433 para Phe) foi capaz de provocar uma proteção significativamente maior dos camundongos contra um desafio, do que a imunização pneumocócica intraperitoneal com PdA (428 Cys para Gly).

PdB mostrou-se protetora também em modelos de pneumonia e sepsis, quando administrada juntamente com PspA (Ogunniyi *et al.*, 2000); de forma semelhante, PdT coadministrada a PspA desencadeou uma resposta imune independente de anticorpos e protetora contra colonização da nasofaringe (Basset *et al.*, 2007). Estes dados reforçam o potencial vacinal de formulações contendo ambas as proteínas.

Outro mutante descrito por Berry *et al.* (1995) contendo uma única mutação na posição 367, a troca de uma His por uma Arg, bloqueava a capacidade de oligomerização da toxina na membrana celular, reduzindo a toxicidade para cerca de 0,02% em comparação com a proteína nativa, porém sem afetar o domínio de interação com o sistema complemento. Esta mutação foi selecionada, no presente trabalho, para produzir dois tipos de mutantes de Ply: um Pd produzido a partir do isolado D39, e outro a partir do pneumococo 472/96. Este segundo contém uma substituição natural de um ácido aspártico por uma asparagina na posição 380 (Ferreira *et al.*, 2006), região previamente descrita por abolir a ativação do complemento (Mitchell *et al.*, 1991).

Estes mutantes foram fusionados geneticamente aos fragmentos codificante da porção N-terminal de PspA 245 (clado 1), produzindo duas proteínas híbridas, 245-PdD39 e 245-Pd472. Os mutantes e híbridos foram avaliados quanto à indução de anticorpos em camundongos.

2. OBJETIVO GERAL

- Investigar o potencial imunogênico de fusões incluindo dois antígenos de pneumococo, Pneumolisina e PspA, em camundongo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção de anticorpos anti-PspA e anti-Pneumolisina em camundongos imunizados com proteínas híbridas;
- Comparar os níveis de anticorpos obtidos pela imunização com os híbridos e com as proteínas isoladas;
- Comparar a produção de anticorpos após imunização com formas detoxificadas de pneumolisina contendo uma ou duas mutações;
- Avaliar o efeito de doses consecutivas das proteínas recombinantes sobre a resposta imune induzida.

3. METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade São Francisco. Foram utilizados 40 camundongos BALB/C, com idade entre 5 e 7 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo – UNICAMP. Os animais foram alojados no biotério da Universidade São Francisco e permaneceram por um período de adaptação de no mínimo 5 dias até o início dos experimentos. Durante os experimentos, os animais tiveram livre acesso à água e alimento e permaneceram com um ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas.

3.2 Proteínas recombinantes

Os mutantes detoxificados de pneumolisina (pneumolisóides), PdD39 e Pd472, foram obtidos por mutagênese sítio dirigida através de reações de PCR consecutivas a partir de cultivos de pneumococo, conforme protocolo adaptado de Higuchi *et al.*, (1988) e Ho *et al.*, (1989). Os genes resultantes foram clonados em vetor de expressão em procariotos, pAE-6xHis, e as proteínas, produzidas em *E. coli* BL21DE3 (Goulart *et al.*, manuscrito em preparação).

Os híbridos foram obtidos pela fusão gênica do fragmento codificante da porção N-terminal de PspA245 a vetores pAE contendo os genes mutantes, através de extremidades coesivas obtidas pela digestão com enzimas de restrição apropriadas (Goulart *et al.*, manuscrito em preparação).

As proteínas de fusão foram produzidas e purificadas de forma semelhante à descrita para os pneumolisóides.

3.3 Esquema de imunização

Camundongos BALB/C foram imunizados pela via subcutânea com rPspA, Pd472, PdD39 sozinho (5 µg/dose) ou um dos híbridos 245/Pd472 e 245-PdD39, em um esquema de 3 doses consecutivas em intervalos de 15 dias, utilizando Alum (50µg/animal/dose) como adjuvante. O grupo controle recebeu apenas Alum. Quatorze dias após cada imunização, uma amostra de 100 µL de sangue foi coletada por punção retro orbital, conforme demonstrado na figura 04:

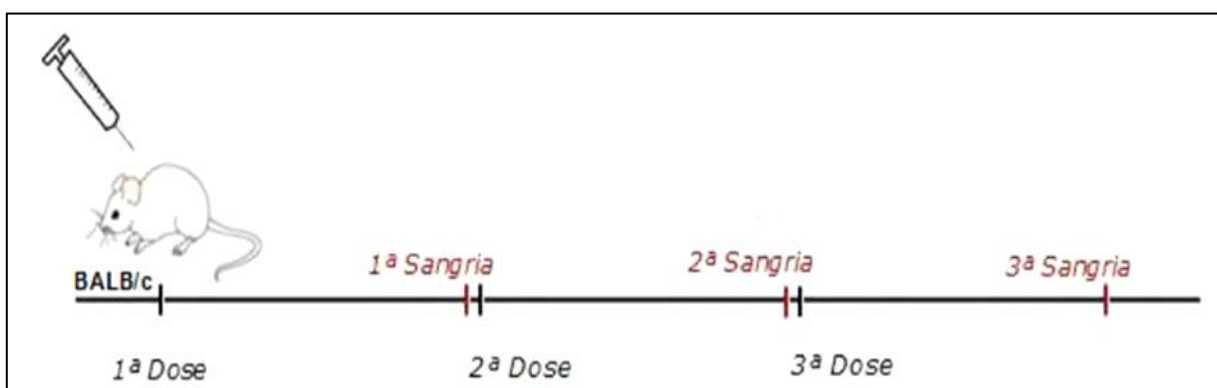


Figura 04 – Esquema da sequência de imunização pela via subcutânea e consecutivas coletas através da sangria por punção retro orbital.

3.4 Avaliação da produção de anticorpos

A indução de anticorpos específicos para rPspA, PdD39 e Pd472 foi avaliada por ELISA. A concentração de anticorpos foi calculada a partir de curva padrão utilizando IgG (Sigma).

Placas de 96 poços foram incubadas a 4 °C por 16 horas com 1 µg/mL/poço de rPspA, PdD39 ou Pd472 (volume final de 100µL por poço) em solução tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). Após incubação, as placas foram lavadas por três vezes com 200µL/poço de uma solução de PBS acrescida de Tween 20 (pH 7,2; concentração 0,05% de T20) e bloqueadas com uma solução de leite desnatado Molico® 10% (m/V) diluída em PBS, incubada 200µL/poço, por 30 minutos a 37 °C, e a seguir, lavadas quatro vezes com PBS-T20 (pH 7,2).

Diluições seriadas de soro ou salina (a partir de 1:20) foram adicionadas às placas em BSA-PBS-T 1% (m/V), e estas foram incubadas a 37 °C por 1 hora e meia. Após as quatro lavagens, realizou-se uma nova incubação da placa com 100µL/poço de uma solução de anticorpos anti-IgG (Sigma), de camundongo produzidos em cabra diluídos (1:10000) em PBS/BSA a 1% por 1 hora. Em seguida as placas foram lavadas quatro vezes com PBS-T20 e incubadas por mais 1 hora, com anticorpo de coelho anti-imunoglobulina de cabra conjugado com peroxidase na concentração de (1: 20000) diluído em PBS-BSA 1% 100µL/poço.

As placas foram reveladas pela adição de 100 µL de uma solução contendo 8 mg de o-fenilenodiamina (OPD) em 20 mL de uma solução tampão citrato/fosfato (pH 5,0) na presença de 10 µL de H₂O₂ 30% (V/V). A reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 4 mol/L. A absorbância foi medida a 492 nm.

3.5 Determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a

A determinação de subclasses IgG1 e IgG2a específicos (Kit Sigma), foi obtida pela sensibilização das placas MaxiSorb com 1µg/mL (100 µL/poço) das proteínas Pd472 e PdD39 em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6; 100µL/poço) “*overnight*” a 4°C. Para as curvas-padrão, foram utilizadas diluições seriadas de IgG1 ou IgG2a (Southern Biotech) partindo-se da concentração inicial de 2 µg/mL. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-Tween 20 (pH 7,2; 0,05%) e bloqueadas com PBS 10% leite Molico® desnatado. As amostras de soro foram adicionadas nas concentrações 1:40 e 1:100, respectivamente e, diluídas serialmente. Seguiu-se nova incubação por 1 hora.

Após as quatro lavagens, foram adicionados 100µL/poço de anticorpo secundário de cabra anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo, na concentração de 1:10000, diluído em PBS-BSA 1%. Após nova incubação de 1h e lavagens, foi adicionado anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado com peroxidase na concentração de 1:20000, diluído em PBS-BSA 1% (100µL/poço). Seguiu-se a última incubação das placas por 1h. Após seis lavagens, a reação colorimétrica foi feita pela adição de 100µL/poço de uma solução substrato contendo 0,5 mg/mL OPD (Sigma), 0,0015% de H₂O₂ em tampão ácido citrato/fosfato, pH 5,0. A reação foi bloqueada pela adição de 50µL/poço de H₂SO₄ 4M e, a absorbância determinada a 492 nm. Os valores das densidades

ópticas (DO) foram convertidos em $\mu\text{g/mL}$ baseando-se em curvas de concentrações dos anticorpos-padrão, IgG1 e IgG2a.

3.6 Análise Estatística

Para verificação de diferença entre médias dos grupos, foi realizado o teste t de Student para amostras independentes, análise de variância (ANOVA) e o programa GraphPad Prism 5 for Windows nos casos em que o ANOVA revelou diferença significativa. Foi considerado $p < 0,05$ para rejeição da hipótese de nulidade.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito de imunizações consecutivas sobre a produção de anticorpos

Os grupos de camundongos BALB/C foram imunizados pela via subcutânea com três doses de rPspA, Pd472 ou PdD39 isolados (5 µg/dose), co-administrados ou um dos híbridos 245Pd472 e 245PdD39. A indução de anticorpos específicos para PspA, PdD39 e Pd472, foi avaliada por ELISA após cada imunização (Figuras 05 a07).

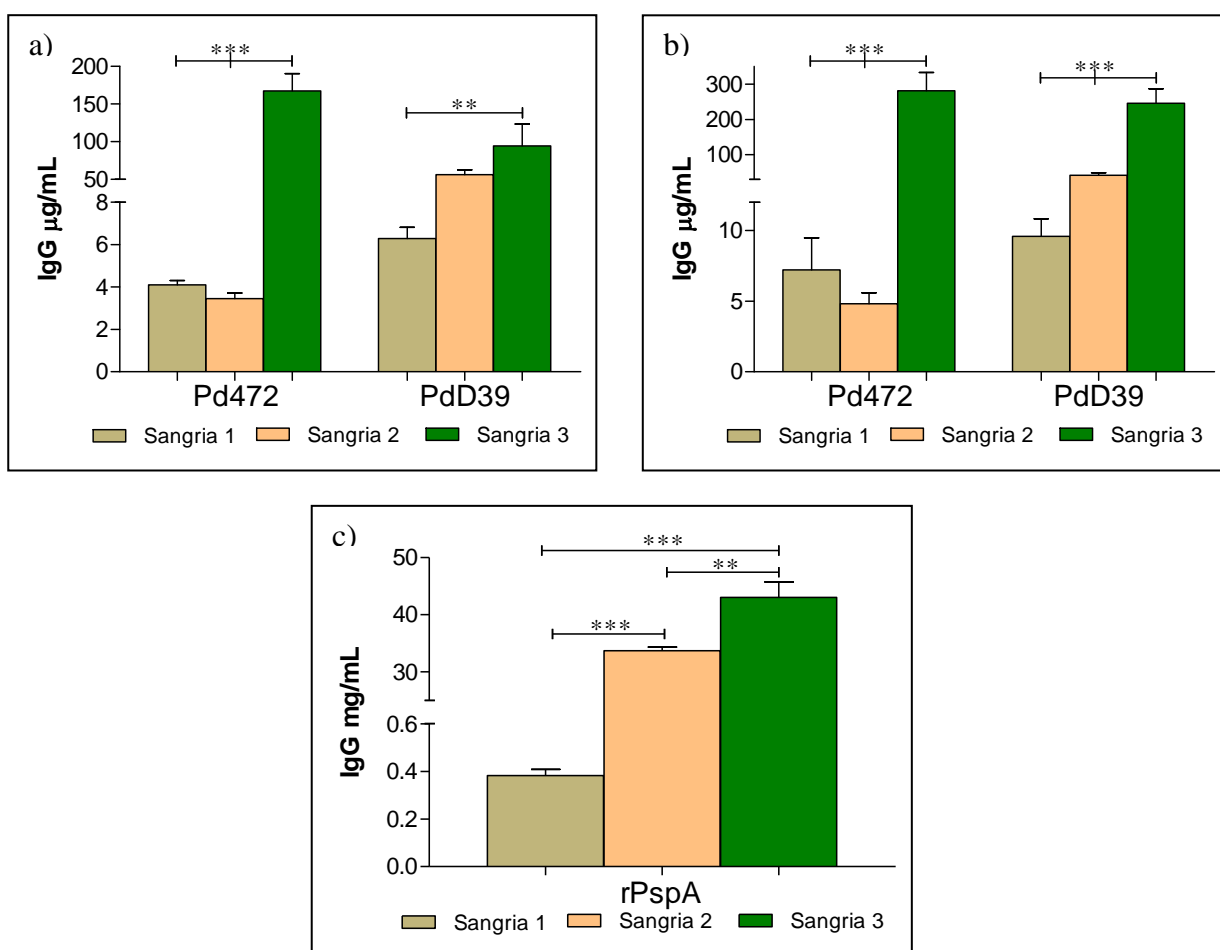


Figura 05 – Análise da produção de anticorpos IgG contra rPspA, Pd472 e PdD39 após uma, duas e três imunizações. Os soros de camundongos imunizados com Pd472 (a), PdD39 (b) ou rPspA (c), foram analisados por ELISA (*** p<0,001; ** p<0,01).

A análise da figura 05 mostra que, de maneira geral, os pneumolisóides Pd472 e PdD39 foram menos imunogênicos do que rPspA, induzindo a produção de níveis mais baixos de anticorpos específicos em todas as doses. No entanto, estes anticorpos foram capazes de identificar ambas as proteínas Pd472 e PdD39.

Com relação ao efeito de doses consecutivas, observa-se um aumento nos níveis de anticorpos a cada dose (booster), é possível observar também que, nos animais imunizados com Pd472, não houve um aumento significativo na produção de anticorpos comparando-se a primeira e segunda dose vacinal (figura 5, comparação entre gráficos a e b para o coating com Pd472). Para o grupo injetado com PdD39, embora seja possível observar um aumento na produção de anticorpos após a segunda imunização, esse não foi significativo em relação à primeira dose (figura 5, comparação entre gráficos a e b para o coating com PdD39). Após a terceira imunização, é possível observar um aumento expressivo nos níveis de anticorpos contra Pd472, nos dois grupos imunizados com os pneumolisóides. Também se observa um aumento dos anticorpos anti-PdD39, que foi mais expressivo no grupo imunizado com este pneumolisóide.

Nos animais imunizados com rPspA, é possível verificar um aumento de cerca de 90 vezes nos níveis de anticorpos entre a primeira e a segunda imunização (figura 5c), um resultado muito superior ao observado nos grupos injetados com os pneumolisóides. Este efeito foi intensificado após a terceira dose vacinal, onde foi verificada a produção de 45mg/mL de anticorpos específicos.

A figura 6 mostra a produção de anticorpos nos grupos imunizados com os antígenos combinados. Os soros de camundongos imunizados com os co-administrados 245+Pd472 e 245+PdD39 foram capazes de reconhecer todas as proteínas de interesse rPspA, Pd472 e PdD39. Na primeira sangria, os grupos imunizados apresentaram níveis de anticorpos semelhantes contra os pneumolisóides Pd472 e PdD39. Após a segunda dose das formulações, embora seja possível observar um discreto aumento nos níveis de IgG nos pneumolisóides PdD39, não houve diferença estatística em relação à primeira dose para nenhum dos grupos Pd472 e PdD39. No entanto, para a PspA houve um aumento significativo ($p < 0,001$) para ambas formulações.

Após a terceira dose dos antígenos, os animais imunizados apresentaram um aumento muito significativo na quantidade de anticorpos contra todos os grupos ($p < 0,001$), semelhante ao observado nos grupos imunizados com as proteínas isoladas.

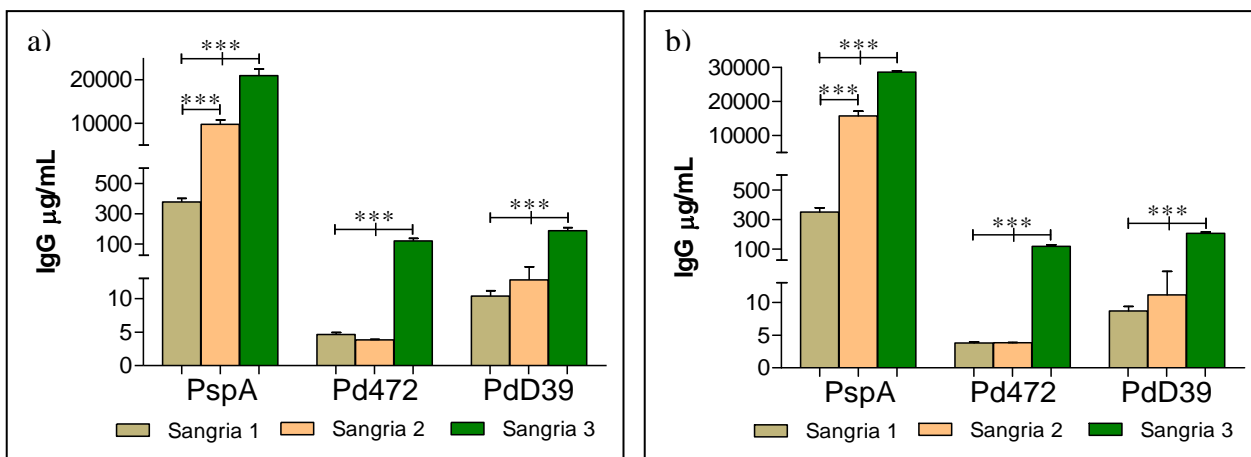


Figura 06 – Análise da produção de anticorpos IgG contra o pneumolisóide Pd472, PdD39 e rPspA, após uma, duas e três imunizações com os antígenos combinados. Os soros de camundongos imunizados com co-administrados 245+Pd472 (a) e 245+PdD39 (b) foram analisados por ELISA (***) $p < 0,001$).

A Figura 07 mostra o nível de anticorpos produzidos pelos híbridos contra as proteínas rPspA, Pd472 e PdD39. De forma semelhante ao observado na imunização com os co-administrados (figura 06), os níveis de anticorpos são bastante superiores contra a rPspA. Da mesma forma, os anticorpos produzidos pelos híbridos foram capazes de reconhecer todas as proteínas de interesse.

Entre a primeira e segunda dose, embora seja possível observar um aumento nos níveis de anticorpos nos grupos imunizados contra PdD39, não houve diferenças significativas. Em relação a rPspA, no entanto, houve um aumento significativo ($p < 0,001$).

Para os pneumolisóides Pd472 e PdD39, apenas após a terceira dose, foi observado um aumento significativo nos níveis de anticorpos ($p < 0,001$ para rPspA, Pd472 e PdD39 (figura 07 (a)) e $p < 0,01$ para PdD39 (figura 07 (b)) em relação à segunda dose). Comparando-se os níveis de anticorpos produzidos pelos híbridos 245Pd472 e 245PdD39, não se observa diferenças significativas em nenhuma das doses avaliadas.

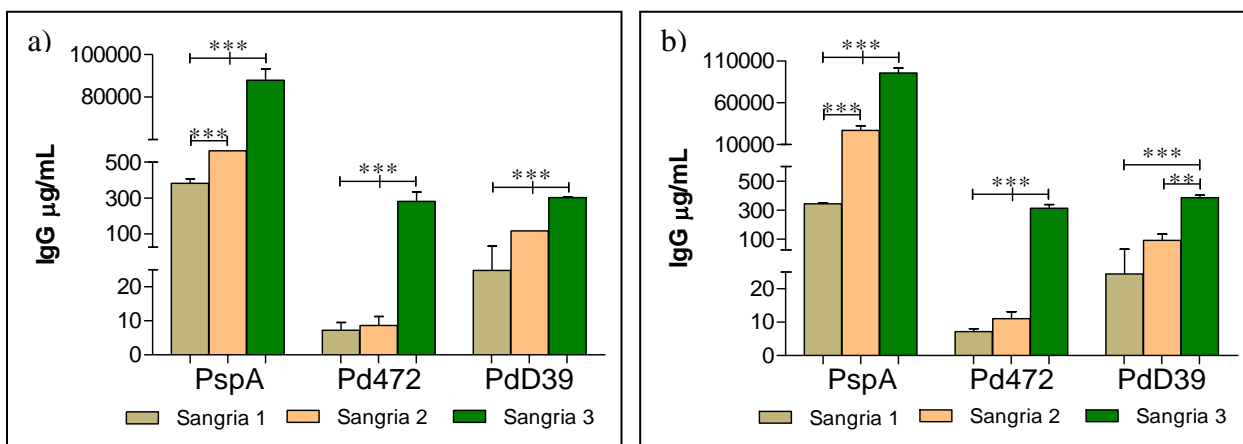


Figura 07 – Análise da produção de anticorpos IgG contra o pneumolisóide Pd472, PdD39 e rPspA, após uma, duas e três imunizações com as proteínas híbridas. Os soros de camundongos imunizados com os híbridos 245Pd472 (a) e 245PdD39 (b) foram analisados por ELISA (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$).

4.2 Reatividade cruzada entre os anticorpos anti-Pd

O reconhecimento cruzado dos anticorpos gerados contra PdD39 e Pd472 foi avaliado por ELISA, após 3 imunizações com as proteínas isoladas, co-administradas ou fusionadas à PspA. Os resultados desta análise são mostrados na figura 08.

A análise da figura 08 revela que, para o coating com Pd472, a imunização com o híbrido PdD39 induziu níveis de anticorpos significativamente superiores aos antígenos co-administrados, mas não aos pneumolisóides isolados. Também, o grupo imunizado com PdD39 isolado apresentou níveis elevados de anticorpos contra as proteínas co-administradas, não havendo diferenças significativas entre os demais grupos (Figura 08 (a)).

Para o coating com PdD39, a imunização com 245PdD39 gerou níveis de anticorpos superiores ao pneumolisóide Pd472 e às proteínas co-administradas, enquanto o grupo imunizado com 245Pd472 apresentou níveis superiores apenas aos do grupo que recebeu Pd472 isolado. Estes resultados sugerem que os híbridos foram capazes de induzir anticorpos contra os dois pneumolisóides, enquanto a co-administração das proteínas teve um efeito deletério. Comparando-se os anticorpos induzidos contra os dois pneumolisóides, não houve diferenças significativas em nenhum dos grupos avaliados (Figura 08, (a) e (b)).

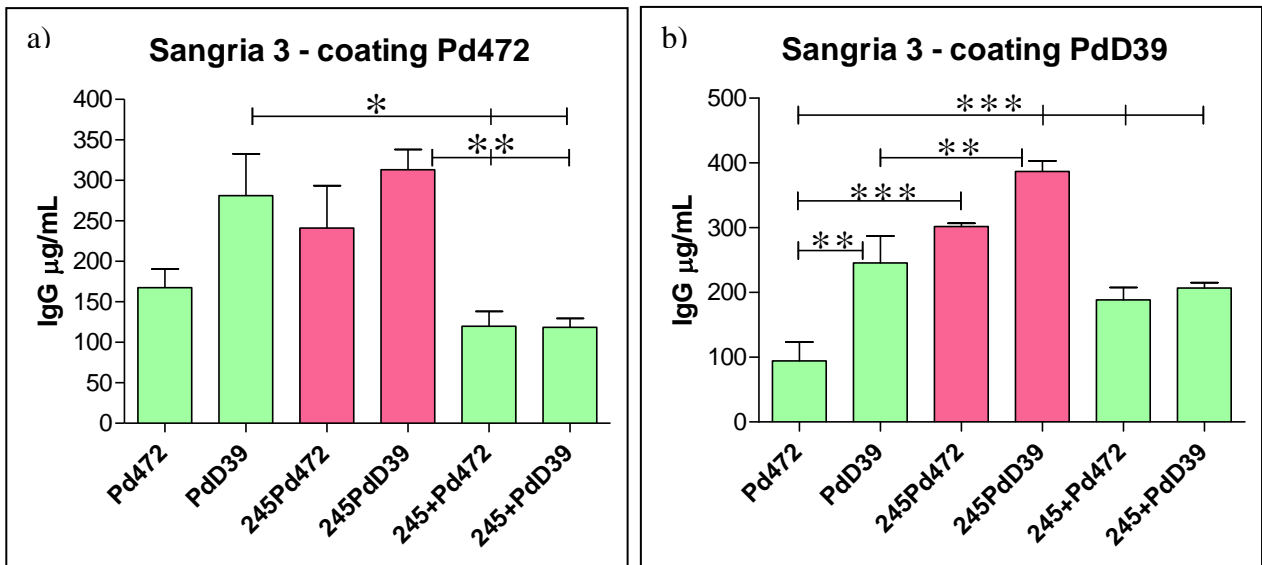


Figura 08 – Análise da reatividade cruzada dos anticorpos com Pd472 e PdD39. Os soros de camundongos imunizados com os pneumolisóides isolados, co-administrados ou fusionados à rPspA foram analisados por ELISA contra as proteínas recombinantes, Pd472 (A) e PdD39 (B) (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ para comparação entre híbridos e fragmentos).

4.3 Reatividade dos anticorpos contra a proteína PspA recombinante

Uma vez determinado o reconhecimento dos pneumolisóides pela imunização com as diferentes formulações, foi investigada a capacidade dos anticorpos induzidos de reconhecer o outro componente vacinal, PspA. Para tanto, soros de animais imunizados com rPspA isolada, híbrida ou co-administrada aos pneumolisóides foram avaliados por ELISA contra rPspA. Os resultados são mostrados na figura 09.

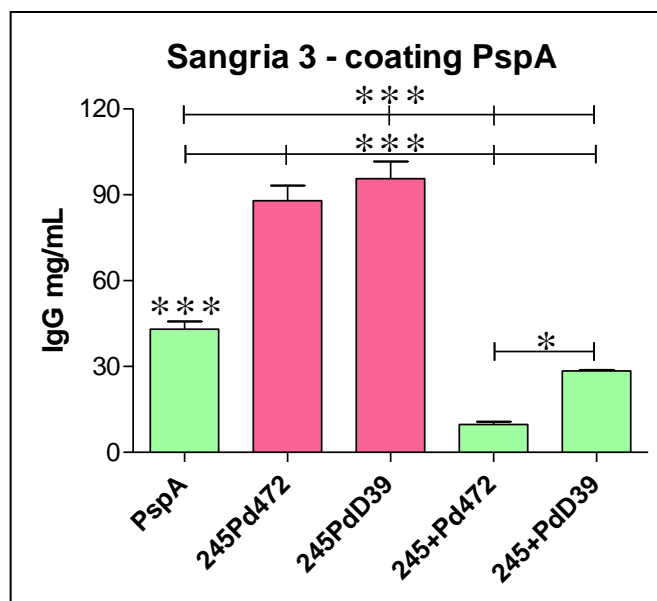


Figura 09 – Análise da produção de anticorpos IgG contra rPspA após três imunizações. Os soros de camundongos imunizados com PspA isolada, fusionada ou co-administrada aos pneumolisóides foram analisados por ELISA contra rPspA (***) $p < 0,001$; * $p < 0,05$; para comparação entre híbridos e fragmentos).

Dentre as formulações avaliadas, os grupos imunizados com os híbridos apresentaram os níveis mais elevados de anticorpos específicos contra PspA, que foram significativamente superiores à proteína isolada ou co-administrada aos pneumolisóides. Não houve diferenças significativas nos níveis de anticorpos entre os dois híbridos.

4.4 Isotipagem de anticorpos anti-IgG1 e IgG2a de camundongos.

Uma vez determinados nos níveis de IgG total induzidos pela imunização com as diferentes formulações, foi realizada a isotipagem dos subgrupos IgG1 e IgG2a, e determinação da razão entre eles. Os resultados desta análise são mostrados na figura 10.

De maneira geral, a imunização com os pneumolisóides induziu níveis semelhantes de IgG1 e IgG2a (uma razão próxima de 1). Com exceção do soro anti-Pd472, em todos os grupos, os níveis de IgG1 foram iguais ou inferiores aos de IgG2a. Interessantemente, a proporção IgG1 x IgG2a para o soro anti-Pd472 foi invertida no coating com PdD39. Os soros que apresentaram

maior diferença na produção de IgG2a em relação a IgG1 foram o anti-Pd472 reagindo contra PdD39, anti-245-PdD39 x Pd472 e o anti-245 + Pd472 x PdD39.

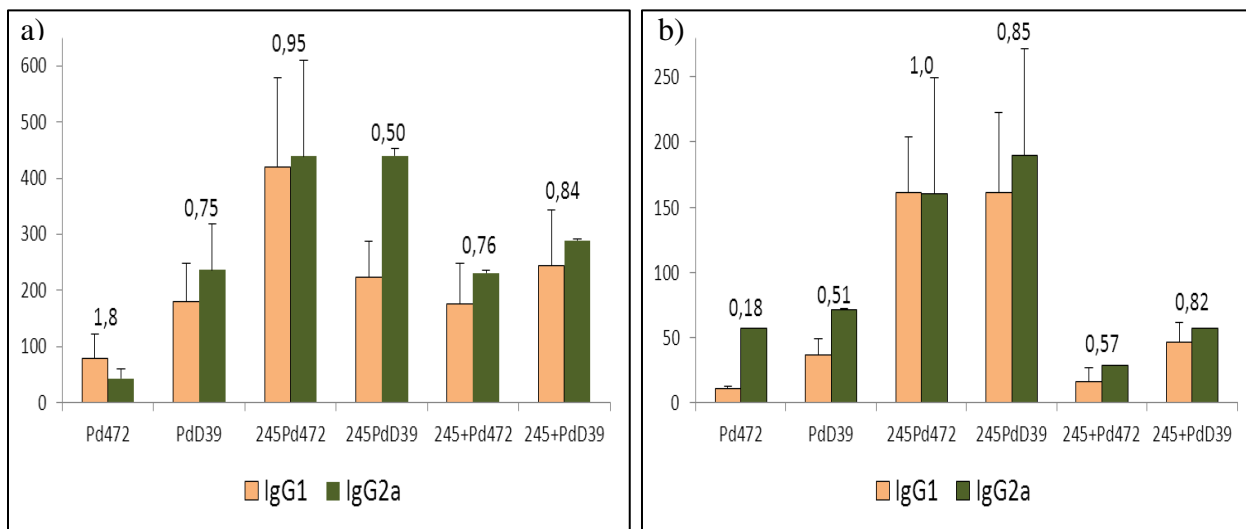


Figura 10 - Análise da produção de anticorpos IgG1 e IgG2a contra os pneumolisóides PdD39 (a) e Pd472 (b). Os soros de camundongos imunizados com os pneumolisóides sozinhos, híbridos ou co-administrados à PspA245 foram analisados por ELISA contra as proteínas recombinantes.

5. DISCUSSÃO

O *Streptococcus pneumoniae* é um importante patógeno humano, causador de otite média, pneumonia, sepse e meningite. Causando elevadas taxas de mortalidade e morbidade no mundo, especialmente em grupos de alto risco, como crianças menores de dois anos de idade, os idosos e imunodeprimidos (Paton *et al.*, 1991; McCullers e Tuomanen, 2001).

Embora existam vacinas anti-pneumocócicas, elas possuem duas grandes deficiências: primeiro seu elevado custo de produção e segundo sua cobertura limitada aos diferentes sorotipos do pneumococo, tornam pouco viável sua utilização em larga escala nos países em desenvolvimento. Assim, a busca por novas alternativas é prioridade em todo mundo.

Uma alternativa para as vacinas de polissacarídeos são os antígenos protéicos do pneumococo (Paton, 1998). As mais promissoras são: PspA e Pneumolisina (Ogunniyi *et al.*, 2007).

Estudos demonstram que os anticorpos contra pneumolisina neutralizam suas atividades citotóxicas e bloqueiam a ativação do complemento pela pneumolisina *in vitro*. Pneumolisina é altamente conservada e produzida por praticamente todas as cepas invasivas do *S. pneumoniae* (Saukkoriipi *et al.*, 2002; Kaijalainen *et al.*, 2002; Cima-Cabal *et al.*, 1999). Assim, o uso da pneumolisina como um antígeno vacinal pode superar a especificidade das vacinas contendo polissacarídeos.

Uma vez que a habilidade de ativar a imunidade inata é característica de moléculas com propriedades adjuvantes, acredita-se que Ply pode ter um efeito adjuvante quando utilizada em conjunto com PspA, promovendo uma resposta imune forte contra ambas proteínas.

Diferentes estudos sugerem que o papel protetor de PspA enquanto candidato vacinal envolve o bloqueio da inibição sobre o sistema complemento (Yuste *et al.*, 2005); assim, a imunização com PspA resulta na produção de anticorpos capazes de ativar a via clássica, através da porção Fc, e a via alternativa, pela inativação das funções de PspA, levando a um aumento na deposição de C3 na bactéria e “clearance” pelo sistema imune (Ren *et al.*; 2004, Darrieux *et al.*, 2008; Goulart *et al.*, 2011).

A prevenção de doenças pneumocócicas baseia-se principalmente na produção de anticorpos que neutralizam a atividade de fatores de virulência, ativam o sistema complemento ou auxiliam na “clearance” pelo sistema imune (Ren *et al.*; 2004b).

Anticorpos para PspA e pneumolisina podem agir em conjunto para aumentar a quantidade de complemento depositado sobre a superfície bacteriana, levando ao clearance bacteriano por fagocitose (Kobzik *et al.*, 1999).

No presente trabalho, foi avaliado o potencial imunogênico de formulações contendo o fragmento N-terminal de PspA, que inclui a maior parte dos epitopos imunogênicos da molécula (McDaniel *et al.*, 1994) e dois mutantes detoxificados da pneumolisina, denominados PdD39 e Pd472. O PdD39 apresenta apenas uma mutação His-367-Arg, que reduz o potencial hemolítico, agora o Pd472 contém, além desta mutação induzida, uma substituição natural de um ácido aspártico por uma asparagina na posição 380, região previamente descrita por abolir a ativação do complemento.

Os mutantes e híbridos foram avaliados quanto à indução de anticorpos em camundongos e analisados por ELISA. Os resultados sugerem que as formas detoxificadas da pneumolisina mantiveram suas propriedades imunogênicas, sendo capazes de induzir a produção de anticorpos reativos contra ambas as proteínas Pd472 e PdD39.

Os resultados demonstram também que em alguns casos, os híbridos apresentaram títulos mais elevados de anticorpos do que aqueles induzidos pelas proteínas isoladas, sugerindo que a fusão não alterou significativamente a estrutura das proteínas, mantendo suas características imunogênicas, o que possibilitou a produção de anticorpos contra os dois pneumolisóides e um possível efeito sinérgico.

Este efeito sinérgico é corroborado pela razão de anticorpos IgG1/IgG2a. A subclasse IgG2a é particularmente melhor na promoção da opsonização pela sua capacidade de interagir com proteínas do sistema complemento (Wilson *et al.*, 1994). Estudos têm demonstrado que a presença de níveis aumentados de IgG2a potencializa a ativação do sistema complemento *in vitro*, podendo aumentar o clearance bacteriano pelo sistema imune (Ferreira *et al.*, 2008).

As diferentes subclasses de IgG humana tem uma grande similaridade as de camundongos, a IgG1 e IgG3 humana e IgG2a e IgG2b camundongo apresentam propriedades semelhantes na fixação de complemento e ligação à antígenos protéicos. IgG4 humana e IgG1 camundongo são similares na sua propriedade de se fixarem à mastócitos (Hussain *et al.*, 1995).

Briles *et al.*, (1981) afirmaram que a subclasse IgG1 é predominante em respostas contra antígenos protéicos tanto em humanos como em camundongos. Portanto, quando observamos os híbridos serem capazes de induzir a produção de IgG1 em níveis maiores que os pneumolisóides

isolados ou co-administrados, podemos sugerir que a resposta determinada por antígenos protéicos nos híbridos ocorreu graças ao sinergismo entre os fragmentos fusionados.

A subclasse IgG2a é muito importante em modelos animais, sendo esta a principal subclasse na deposição de complemento, a defesa contra infecção pneumocócica é amplamente dependente da opsonização da bactéria por anticorpos sorotipos-específicos e complemento. Desta forma a eficácia dos híbridos é demonstrada na habilidade significativa de ativação dos anticorpos IgG2a. A razão IgG1/IgG2a dos anticorpos induzidos pelas imunizações foram próximas a 1,0 sugerindo a produção de anticorpos fixadores de complemento.

Trabalhos demonstram que um aumento na produção de IgG2a em relação à IgG1 promove uma maior deposição de complemento, mesmo quando os níveis totais de anticorpos são menores (Ferreira *et al.*, 2008). Estes resultados foram obtidos a partir da imunização de camundongos com a vacinas de DNA e outros utilizando mutantes detoxificados de ply na forma de proteínas recombinantes, demonstrando que os níveis de anticorpos IgG total eram maiores em camundongos imunizados com as proteínas recombinantes. Observou-se também que houve um predomínio de anticorpos IgG1 para proteínas recombinantes e nos demais grupos ocorreu uma quantidade balanceada de anticorpos IgG1 e IgG2a, entretanto, as proteínas recombinantes ou vacinas de DNA demonstraram habilidades semelhantes para mediar a deposição de complemento. Embora seja possível observar que ambas imunizações são capazes de conferir uma proteção contra um desafio, a imunização com vacinas de DNA mostrou uma resposta qualitativa superior, por induzir uma razão IgG1/IgG2a equilibrada, apresentando assim uma mediação mais eficiente na deposição do complemento.

Diversos estudos sugerem que PspA e ply induzem proteção contra seps e pneumonia (Kobzik *et al.*, 1999). Também foi demonstrado que a co-administração destes antígenos é capaz de ampliar os efeitos de cada proteína isolada. Um estudo com mutante detoxificado de ply e PspA co-administrados mostrou que esta formulação pode aumentar a proteção contra uma variedade ampla de cepas, quando comparado com a imunização feita por antígenos isolados. Os resultados de experimentos de proteção passiva sugerem um papel importante dos anticorpos neste modelo, uma vez que os camundongos que receberam soros co-administrados tiveram um tempo de sobrevivência significativamente maior do que os soros com proteínas isoladas (Ogunniyi *et al.*, 2000). De forma semelhante, Hamel *et al.*, (2004) mostrou que a combinação de PspA e PdB foi capaz de induzir proteção contra desafio intraperitoneal com um isolado virulento

de pneumococo sorotipo 6A, enquanto PdB isolada não protegeu neste modelo (Ogunniyi *et al.*, 2007).

A combinação de PspA e PdB também se mostrou protetora em modelo de pneumonia em camundongos, reduzindo o número de unidades formadoras de colônias no pulmões em 110 vezes do que o alcançado com PspA isolada e 1100 vezes do que o obtida com PdB isoladamente (Ogunniyi *et al.*, 2003).

Um estudo mais recente avaliando as respostas da mucosa para antígenos protéicos fusionados à Ply demonstrou que estas formulações são capazes de induzir uma produção rápida de anticorpos tanto no sangue quanto na superfície da mucosa (Douce *et al.*, 2010). Em particular, a fusão das proteínas recombinantes PsaA e Ply induziu elevados níveis de anticorpos antígeno-específicos. No entanto, esta resposta imune foi insuficiente para proteger os animais contra a infecção local ou sistêmica contra várias cepas de *S. pneumoniae*.

Em conjunto, os resultados sugerem que vacinas híbridas contendo PspA e mutantes detoxificados de pneumolisina representam uma estratégia vacinal promissora, capaz de induzir a produção de elevados níveis de anticorpos contra os dois componentes vacinais e proporcionar uma imunização equilibrada capaz de agir sinergicamente na promoção da opsonização e, conseqüentemente, da eliminação da bactéria pelo sistema imune.

6. CONCLUSÃO

- Vacinas híbridas contendo PspA e pneumolisóides detoxificados promoveram a indução de elevados níveis de anticorpos em camundongos;
- Em alguns casos, as vacinas híbridas mostraram-se superiores às proteínas co-administradas, sugerindo um possível efeito sinérgico;
- A razão IgG1/IgG2a dos anticorpos induzidos pelas imunizações foi equilibrada, sugerindo que a produção anticorpos foram capazes de agir sinérgicamente na promoção da opsonização e reforçar o sistema complemento, um mecanismo importante na eliminação do pneumococo pelo hospedeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Autrian, R. Pneumococcal polysaccharide vaccines. **Infect Dis**, 11:598-602, 1989.

Balachandran, P.; Hollingshead, S. K.; Paton, J. C.; Briles, D. E. The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. **J. Bacteriol.**, 183:3108–3116, 2001.

Baltimore, R.S.; Shapiro, E. D. Pneumococcal infections. 2nd ed. New York: **Plenum Medical Book Co**, 1991.

Basset, A. C. M.; Thompson, S. K.; Hollingshead, D. E.; Briles, E. W.; Ades, M.; Lipsitch, R. Malley. Antibody-independent, CD4+ T-cell-dependent protection against pneumococcal colonization elicited by intranasal immunization with purified pneumococcal proteins. **Infect Immun**, 75:5460-5464, 2007.

Beall, B.; Gherardi, G.; Facklam, R. R.; Hollingshead, S. K. Pneumococcal PspA sequence types of prevalent multiresistant pneumococcal strains in the United States and of internationally disseminated clones. **J Clin Microbiol**, 38:3663-3669, 2000.

Bernatoniene, J.; Zhang, Q.; Dogan, S.; Mitchell, T. J.; Paton, J. C. Induction of CC and CXC chemokines in human antigen-presenting dendritic cells by the pneumococcal proteins pneumolysin and CbpA, and the role played by toll-like receptor 4, NF-kappaB, and mitogen-activated protein kinases. **J Infect Dis**, 198:1823–1833, 2008.

Berry, A. M.; Alexander, J. E.; Mitchell, T. J.; Andrew, P. W.; Hansman, D.; Paton, J. C. Effect of defined point mutations in pneumolysin gene on the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun**, 63:1969-1974, 1995.

Bhakdi, S., and J. Tranum-Jensen. Damage to cell membranes by poreforming bacterial cytolysins. *Prog. Allergy*. 40:1-43, 1988.

Bosarge, J. R.; Watt, J. M.; McDaniel, D. O.; Swiatlo, E.; McDaniel, L. S. Genetic immunization with the region encoding the alpha-helical domain of PspA elicits protective immunity against *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun**, 69:5456–5463, 2001.

Boulnois, G. J.; Paton, J. C.; Mitchell, T. J.; Andrew, P. W. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol Microbiol**, 5:2611–2616, 1991.

Braido, F.; Bellotti, M.; Maria, A. D. “The role of Pneumococcal vaccine”, **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, 21:608–615, 2008.

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

Brandileone, M. C.; Andrade, A. L.; Teles, E. M.; Zanella, R. C.; Yara, T. I.; Di Fabio, J. L.; Hollingshead, S. K. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine**, 22:3890-3896, 2004.

Brandileone, M. C. C.; Casagrande, S. T.; Guerra, M. L. L. S.; Zanella, R. C.; Andrade, A. L. S. S.; Di Fabio, L. Increase in numbers of b-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **Journal of Medical Microbiology**, London, 55:567-574, 2006.

Briles, D. E. *et al.*, Mouse IgG3 antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*. **Nature**, 294:88-90, 1981.

Briles, D. E.; Hollingshead, S.; Brooks, W. A. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine**, 18:1707–1711, 2000a.

Briles, D. E.; Hollingshead, S. K.; Swiatlo, E.; Brooks, W. A.; Szalai, A.; Virolainen, A.; McDaniel, L. S.; Benton, K. A.; Aerts, P. C.; Dijk, H. V.; Crain, M. J. Pneumococcal proteins PspA and PspC: their potential for use as vaccines, In A. Tomasz (ed.), *Streptococcus pneumoniae*, molecular biology and mechanisms of disease. **Mary Ann. Liebert**, New York, p. 253–260, 2000b.

Briles, D. E.; Hollingshead, S. K.; King, J.; Swift, A.; Braun, P. A.; Park, M. K.; Ferguson, L. M.; Nahm, M. H.; Nabors, G. S. Immunization of humans with PspA elicits antibodies, which passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. **J Infect Dis**, 182:1694-1701, 2000c.

Briles, D. E.; Hollingshead, S. K.; Paton, J.; Ades, E.; Novak, L.; Van Ginkel, F.; Benjamin, W. J. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis**, 188:339–348, 2004.

Buckley, R. H. IgG Subclass deficiency. **Clinical Focus on Primary Immune Deficiencies: Issues and information on current topics**, 1(3):1-4, 1998.

CDC. Pneumococcal Disease. In: Atkinson W HJ, McIntyre L, Wolfe S, editor. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. 10 ed. Washington DC: Public Health Foundation; 2007.

Cima-Cabal, M.D.; Vazquez, F.; Jr, T. I.; Mendez, F. J. Rapid and reliable identification of *Streptococcus pneumoniae* isolates by pneumolysin-mediated agglutination. **J. Clin. Microbiol**, 37:1964–1966, 1999.

Crook, D. W.; Spratt, B. G. Multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Br Med Bull**, 54(3):595-610, 1998.

Darrieux, M.; Miyaji, E. N.; Ferreira, D. M.; Lopes, L. M.; Lopes, A. P.; Ren, B.; Briles, D. E.; Hollingshead, S. K.; Leite, L. C. Fusion proteins containing family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that correlates with antibody-mediated enhancement of complement deposition. **Infect Immun**, 75:5930-5938, 2007.

Darrieux, M.; Moreno, A. T.; Ferreira, D. M.; Pimenta, F. C.; Andrade, A. L. S.; Lopes, A. P. Y.; Leite, L. C. C.; Miyaji, E. N. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **Journal of Medical Microbiology**. 57(3):273-278, 2008.

Dave, S.; Carmicle, S.; Hammerschmidt, S.; Pangburn, M. K.; McDaniel, L. S. Dual roles of PspC, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, in binding human secretory IgA and factor H. **J. Immunol**. 173:471-477, 2004.

Dawson, C. What is a pneumococcus? In Tuomanen E MT, Morrison DA, Spratt BG ed. *The Pneumococcus*. 2 ed. Washington, D.C.: ASM, p. 30-48, 2004.

De Velasco, A. E.; Verheul, A. F.; Verhoef, J.; Snipre, H. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis and Vaccines. **Microbiol, Rev.**, 59(4):591-603, 1995.

Douce, G.; Ross, K.; Cowan, G.; Ma, J.; Mitchell, T. J. M. Novel mucosal vaccines generated by genetic conjugation of heterologous proteins to pneumolysin (PLY) from *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, 28:3231-3237, 2010.

Ferreira, D. M.; Arêas, A. P. M.; Darrieux, M.; Leite, L. C. C.; Miyaji, E. N. DNA vaccines based on genetically detoxified derivatives of pneumolysin fail to protect mice against challenge with *Streptococcus pneumoniae* **FEMS**, 2006.

Ferreira, D. M.; Darrieux, M.; Oliveira, M. L. S.; Leite, L. C. C.; Miyaji, E. N. Optimized Immune Response Elicited by a DNA Vaccine Expressing Pneumococcal Surface Protein A Is Characterized by a Balanced Immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a Ratio and Proinflammatory Cytokine Production. **Clin. Vaccine. Immunol**, 15(3):499, 2008.

Finland, M.; Pneumococcal infections. In: Evans, A.S.; Feldman, H. A. editor. Bacterial infections of humans: epidemiology and control. New York: **Plenum Medical**, p. 417-433, 1982.

Gilbert, R. J. C.; Jiménez, J.; Chen, S.; Tickle, I. J.; Rossjohn, J.; Parker, M.; Andrew, P.; Saibil, H. R. Two Structural Transitions in Membrane Pore Formation by Pneumolysin, the Pore-Forming Toxin of *Streptococcus pneumoniae*. **CELL**, 97:647-655, 1999.

Gor, D. O.; Ding, X.; Briles, D. E.; Jacobs, M. R.; Greenspan, N. S. Relationship between surface accessibility for PpmA, PsaA, and PspA and antibody-mediated immunity to systemic infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, 73:1304-1312, 2005.

Goulart, C.; Darrieux, M.; Rodriguez, D.; Pimentad, F. C.; Brandileone, M. C. C.; Andrade, A. L.; Leite, L. C. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**, 29:1634–1642, 2011.

Hamel, J.; Charland, N.; Pineau, I.; Ouellet, C.; Rioux, S.; Martin, D.; Brodeur, B. R. Prevention of pneumococcal disease in mice immunized with conserved surface-accessible proteins. **Infect. Immun**, 72:2659–2670, 2004.

Higuchi, R.; Krummell, B.; Saiki, R. K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. **Nucleic Acids Res**, 16(15):7351-7367, 1988.

Hirst, R.A.; Kadioglu, A.; O'Callaghan, C.; Andrew, P. W. The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. **Clin. Exp. Immunol**, 138:195–201, 2004.

Ho, S. N.; Hunt, H. D.; Horton, R. M.; Pullen, J. K.; Pease, L. R. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. **77(1):51-59**, 1989.

Hollingshead, S. K.; Becker, R. S.; Briles, D. E. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.** 68:5889-5900, 2000.

Hussain, R. *et al.*, Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, 2(6):726-732, 1995.

Janeway, C. A. JR. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 6^a ed. – Porto Alegre: **Artmed**, 2007.

Janulczyk, R.; Iannelli, F.; Sjöholm, A. G.; Pozzi, G.; Björck, L. Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. **J. Biol. Chem.** 275:37257–37263, 2000.

Jarva, H.; Jokiranta, T. S.; Würzner, R.; Meri, S. Complement resistance mechanisms of streptococci. *Mol. Immunol.* 40:95–107, 2003.

Jedrzejak, M. J.; Lamani, E.; Becker, R. S. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. **J Biol Chem**, 276:33121-33128, 2001.

Johnson, M. Cellular location of pneumolysin. **FEMS Microbiol. Lett.** 2:243–245, 1977.

Johnston, R. B. Jr.; The host response to invasion by *Streptococcus pneumoniae*: protection and the pathogenesis of tissue damage. *Rev. Infect. Dis.*, 3:282-288, 1981.

Kadioglu, A.; Coward, W.; Colston, M.; Hewitt, C; Andrew, P. CD4-T-lymphocyte interactions with pneumolysin and pneumococci suggest a crucial protective role in the host response to pneumococcal infection. **Infect. Immun.**, 72:2689–2697, 2004.

Kadioglu, A.; Weiser, J. N.; Paton, J. C.; Andrew, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Pub. Group Microbiol.*, 6:288-301, 2008.

Kaijalainen, T.; Rintamaki, S.; Herva, E.; Leinonen, M. Evaluation of gene–technological and conventional methods in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Microbiol. Methods**. 51:111–118, 2002.

Kerr, A. R.; Paterson, G. K.; McCluskey, J.; Iannelli, F.; Oggioni, M. R.; Pozzi, G.; Mitchell, T. J. The contribution of PspC to pneumococcal virulence varies between strains and is accomplished by both complement evasion and complement-independent mechanisms. **Infect. Immun**, 74:5319 – 5324, 2006.

Kobzik L. The lung. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, eds. Robbins pathogenic basis of disease. **WB Saunders**, 717–21, 1999.

Krushkal, J.; Bat, O.; Gigli, I. Evolutionary relationships among proteins encoded by the regulator of complement activation gene cluster. **Mol. Biol. Evol**, 17:1718–1730, 2000.

Low, D. E. Changing trends in antimicrobial-resistant pneumococci: it's not all bad news. **Clin Infect Dis**, 41(4):228-33, 2005.

Malley, R.; Henneke, P.; Morse, S. C.; Cieslewicz, M. J.; Lipsitch, M.; Thompson, C. M.; Kurt-Jones, E.; Paton, J. C.; Wessels, M. R.; Golenbock, D. T. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100:1966-1971, 2003.

Malley, R. Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. **J. Mol. Med. Review**, 88:135-142, 2009.

Marriot H. M.; Dockrell D. H. *Streptococcus pneumoniae*: the role of apoptosis in host defense and pathogenesis. **Int J. Biochem Cell Biol.**, 38(11):1848-1854, 2006.

McCullers, J. A.; Tuomanen, E. I. Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. **Front Biosci**, 6:877–889, 2001.

McDaniel, L. S.; Swiatlo, E. Pneumococcal disease: pathogenesis, treatment, and prevention. **Infect. Dis.**, Clin. Pract., 12:93–98, 2004.

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.

Mitchell, T. J.; Andrew, P. W.; Sannders, F. K.; Smith, A. N.; Bouinois, G. J. Complement activation and antibody binding by pneumolysin via a region of the toxin homologous to a human acute phase protein. **Mol Microbiol**, v. 5, p. 1883-8, 1991.

Mitchell, T. J.; Alexander, J. E.; Morgan, P. J.; Andrew, P. W. Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. **Soc. Appl. Bacteriol. Symp.** Ser. 26, p. 62S–71S, 1997.

Miyaji, E. N.; Ferreira, D. M.; Lopes, A. P.; Brandileone, M. C.; Dias, W. O.; Leite, L. C. 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**, 70:5086-5090, 2002.

Mollerach, M.; Ragueira, M.; Bonofiglio, L.; Callejo, R.; Pace, J.; Di Fabio, J. L.; Hollingshead, S.; Briles, D. E. Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentinian children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA) and genetic diversity. **Epidemiol Infect**, 132:177-184, 2004.

Moreno, A. T.; Oliveira, M. L.; Ferreira, D. M.; Ho, P. L.; Darrieux, M.; Leite, L. C. 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.

Musher, D. M. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell, G. L.; Bennett, J. E.; Dolin, R., editor. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 6 ed. Philadelphia: **Elsevier Churchill Livingstone**, 2392-2411, 2005.

Nabors, G. S.; Braun, P. A.; Herrmann, D. J.; Heise, M. L.; Pyle, D. J.; Gravenstein, S.; Schilling, M.; Ferguson, L. M.; Hollingshead, S. K.; Briles, D. E.; Becker, R. S. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies. **Vaccine**, 18:1743-1754, 2000.

Nakamura, M.; Sekino-Suzuki, N.; Mitsui, K.; Ohno-Iwashita, Y. Contribution of tryptophan residues to the structural changes in perfringolysin O during interaction with liposomal membranes. **J. Biochem.** 123:1145–1155, 1998.

Ogunniyi, A. D.; Folland, R. L.; Briles, D. B.; Hollingshead, S. K.; Paton, J. C. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun**, 68:3028-3033, 2000.

Ogunniyi, A. D.; Briles, D. E.; Hollingshead, S. K.; Paton, J. C.; Ades, E. W.; Novak, L.; Ginkel, F. W.; Benjamin, W. H. B. Immunizations with Pneumococcal Surface Protein A and Pneumolysin Are Protective against Pneumonia in a Murine Model of Pulmonary Infection with *Streptococcus pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases**, 188:339-48, 2003.

Ogunniyi, A. D.; LeMessurier, K. S.; Graham, R. M.; Watt, J. M.; Briles, D. E.; Stroehrer, U. H.; Paton, J. C. Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. **Infect Immun**, 75:1843-1851, 2007.

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

Paton, J. C.; Ferrante, A. Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. **Infect. Immun.**, 41:1212-1216, 1983.

Paton, J. C.; Kelly, B. R.; Ferrante, A. Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. **Infect. Immun.**, 43: 1085–1087, 1984.

Paton, J. C.; Lock, R. A.; Lee, C. J. Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to *Streptococcus pneumoniae* type 19F polysaccharide. **Infect Immun.**, 59:2297–2304, 1991.

Paton, J. C. Novel pneumococcal surface proteins: role in virulence and vaccine potential. *Trends Microbiol.* 6:85-87, 1998.

Pimenta, F. C.; Ribeiro-Dias, F.; Brandileone, M. C.; Miyaji, E. N.; Leite, L. C.; Sgambatti, A. L. Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during an ongoing surveillance study of children in Brazil. **J Clin Microbiol**, 44:2838-2843, 2006.

Pletz, M. W.; Maus, U.; Krug, N. “Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species”, **International Journal of Antimicrobial Agents**, 32(3):199-206, 2008.

Price, K. E.; Camilli, A. Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, 191(7):2163-2168, 2009.

Quin, L. R.; Carmicle, S.; Dave, S.; Pangburn, M. K.; Evenhuis, J. P.; McDaniel, L. S. In vivo binding of complement regulator factor H by *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis**, 192:1996–2003, 2005.

Ren, B.; Szalai, A. J.; Thomas, O.; Hollingshead, S. K.; Briles, D. E. Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, 71:75 – 85, 2003.

Ren, B.; Szalai, A. J.; Hollingshead, S. K.; Briles, D. E. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. **Infect Immun**, 72:114-122, 2004a.

Ren, B., McCrory, M. A.; Pass, C.; Bullard, D. C.; Ballantyne, C. M.; Xu, Y.; Briles, D. E.; Szalai, A. J. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. **J. Immunol.**, 173:7506–7512, 2004b.

Rodriguez, D. C.; Gordillo J. E.; Goicoechea E. D. J.; Trascasa M. L.; Corral P. S. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. **Mol Immunol**, 41:355-367, 2004.

Rosenow, C.; Ryan, P.; Weiser, J. N.; Johnson, S.; Fontan, P.; Ortqvist, A.; Masure, H. R. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol**, 25:819–829, 1997.

Rossjohn, J.; Feil, S. C.; McKinstry, W. J.; Tweten, R.K.; Parker, M.W. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell*, 89:685–692, 1997.

Rossjohn, J.; Gilbert, R. J.; Crane, D.; Morgan, P. J.; Mitchell, T. J.; Rowe, A. J.; Andrew, P. W.; Paton, J. C.; Tweten, R. K.; Parker, M. W. The molecular mechanism of pneumolysin, a virulence factor from *Streptococcus pneumoniae*. **J. Mol. Biol.**, 284:449–461, 1998.

Saeland, E.; Leusen, J. H. W.; Vidarsson, G.; Kuis, W.; Sanders, E. A. M.; Jonsdottir, I.; Winkel, J. G. J. Role of leukocyte immunoglobulin G receptors in vaccine – induced immunity to *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, 187:1686-1693, 2003.

Saukkoriipi, A.; Palmu, A.; Kilpi, T.; Leinonen, M. Real-time quantitative PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* in the middle ear fluid of children with acute otitis media. **Mol. Cell Probes**. 16:385–390, 2002.

Saunders, F. K.; Mitchell, T. J.; Walker, J. A.; Andrew, P. W.; Boulnois, G. J. Pneumolysin, the thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for in vitro activity. **Infect. Immun**, 57:2547–2552, 1989.

Shepard, L. A.; Heuck, A. P.; Hamman, B. D.; Rossjohn, J.; Parker, M. W.; Ryan, K. R.; Johnson, A.E.; Tweten, R. K. Identification of a membrane-spanning domain of the thiol-activated pore-forming toxin *Clostridium perfringens* perfringolysin. **Biochemistry**, 37:14563–14574, 1998.

Swiatlo, E.; Ware, D. Novel vaccine strategies with protein antigens of *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, 38:1-7, 2003.

Tai, S. S. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. **Crit Rev Microbiol** 32:139-153, 2006.

Tart, R. C.; McDaniel, L. S.; Ralph, B. A.; Briles, D. E. Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. **J. Infect. Dis.** 173:380-386, 1996.

Tavares W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos. 3 ed. São Paulo: **Atheneu**; 2001.

Tilley, S.; Orlova, E.; Gilbert, R.; Andrew, P.; Saibil, H. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. **Cell**, 121:247–256, 2005.

Thornton, J.; McDaniel, L. S. THP-1 monocytes up-regulate intercellular adhesion molecule 1 in response to pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun**, 73:6493–6498, 2005.

Tomaz, A. *Streptococcus pneumoniae*. Molecular biology & mechanisms of disease. New York: **Mary Ann Liebert**, 2000.

Tu, Y.; Li, F.; Goicoechea, S.; Wu, C. The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Mol Cell Biol*, **19**:2425–2434, 1999.

Tuomanen, E. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2:35-39, 1999.

Vela Coral, M. C.; Fonseca, N.; Castaneda, E.; Di Fabio, J. L.; Hollingshead, S. K.; Briles, D. E. Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. *Emerg Infect Dis*, 7:832-836, 2001.

Yoshioka, Cristina R. M; Martinez, Marina B; Brandileone, Maria C. C; Ragazzi, Selma B; Guerra, Maria L. L. S; Santos, Silvia R; Shieh, Huei H; Gilio, Alfredo E. Análise das cepas de *Streptococcus pneumoniae* causadores de pneumonia invasiva: sorotipos e sensibilidade aos antimicrobianos. *J. pediatr. Rio de Janeiro*; 87:70-75, 2011.

Yother, J.; Tuomanen, E. I.; Mitchell, T. J.; Morrison, D. A.; Spratt, B. The pneumococcus. **ASM Press**, Washington, DC. Capsules, 30–48, 2004.

Yuste, J.; Botto, M.; Paton, J. C.; Holden, D. W.; Brown, J. S. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J. Immunol*, 175:1813–1819, 2005.

Watson, D.A.; Musher, D.M.; Verhoef, J. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 14:479–90, 1995.

White, B. History of pneumococcus. In: White, B. editor. The biology of pneumococcus. 1 ed. New York: **The Commonwealth Fund**; p. 1-29, 1938.

Wilson, M. E.; Bronson, P.M.; Hamilton, R.G. Immunoglobulin G2 Antibodies Promote Neutrophil Killing of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infection and Immunity**, 63:1070-1075, 1994.

Zhang, J. R.; Mostov, K. E.; Lamm, M. E.; Nanno, M.; Shimida, S.; Ohwaki, M.; Tuomanen, E. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. **Science Direct**, 102:827-837, 2000.