

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

BÁRBARA MILANI FRÓES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INDOLICIDINA SOBRE
Streptococcus pneumoniae SELVAGEM E MUTANTE PARA O
GENE *pspA***

Bragança Paulista

2019

BÁRBARA MILANI FRÓES – R.A. 001201708947

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INDOLICIDINA SOBRE
Streptococcus pneumoniae SELVAGEM E MUTANTE PARA O
GENE *pspA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para exame de Arguição Final- Mestrado.

Área Concentração: Biologia Celular e Molecular de Microrganismo

Orientador: Prof^a Dr^a Michelle Darrieux Sampaio Bertocini

Bragança Paulista

2019

WC 217 Fróes, Bárbara Milani
F956a Avaliação dos efeitos da indolicidina sobre *Streptococcus pneumoniae* selvagem e mutante para o gene *pspA* / Bárbara Milani Fróes. - Bragança Paulista, 2019.
52 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. Proteína de superfície de pneumococo. 3. Indolicidina. I. Bertoncini, Michelle Darrieux Sampaio. II. Título.

FROES, Bárbara Milani “*Avaliação dos Efeitos da Indolicidina Sobre Streptococcus Pneumoniae Selvagem e Mutante para o Gene pspA*”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 29 de agosto de 2019 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini (Orientadora)
Universidade São Francisco

Raquel Girardello
Universidade São Francisco

Walter Rodrigo Politano
Secretaria de Educação do Estado de São Paulo

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por estar ao meu lado ao longo desse projeto me enviando força e coragem em todos os momentos. Ao longo desses 2 anos de mestrado Deus nunca me abandonou, mostrou que quem planta fé colhe milagres. Me curou de uma doença desenvolvida nesse período, em que ouvi que chance de cura era de 10%. Os médicos não souberam explicar a cura, mas eu, meu marido, minha mãe, toda família e amigos que unimos em uma corrente de oração sabemos exatamente a resposta dessa cura, DEUS. Deus é dono de toda ciência, sabedoria e poder, para ele nada é impossível, minha eterna gratidão.
- A minha orientadora Prof^a Dr^a Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini que apoiou, acreditou e confiou em mim. Que mesmo em outro país sempre esteve presente. Em todos os momentos que tivemos juntas, muito paciente e dona de uma educação pouco conhecida. Não tenho palavras para agradecer.
- Ao meu marido, Anderson Rodrigo, por todo o companheirismo, paciência, incentivo e amor. A vida é feita de escolhas e sem dúvida a melhor escolha da minha vida foi ter casado com uma pessoa tão especial, um homem de fé e que aumentou a minha fé, que me fez ser mais forte e que em todos os momentos da minha vida sempre esteve ao meu lado. Eu não tenho palavras para expressar minha gratidão.
- A minha mãe, Regina, por apoiar e incentivar minhas escolhas, por sempre me dar carinho, atenção e amor. Uma mãe incrível, tudo o que sou ou pretendo ser devo exclusivamente a essa mulher que Deus escolheu para ser minha mãe.
- A minha vó, Maria Tereza, pela sua história inspiradora, um exemplo de que uma mulher pode conquistar tudo em qualquer idade, basta ter força e coragem.
- À Universidade São Francisco pela excelente formação acadêmica que me foi oferecida
- Ao Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz, que assumiu minha orientação por 1 ano;
- À coordenação, professores e colegas do curso de *Pós-Graduação Stricto Sensu* em Ciências da Saúde.
- Aos colegas do Laboratório de pesquisa de Biologia Molecular de Microrganismos por contribuírem para o meu crescimento científico e por me auxiliarem na realização dos experimentos, em especial Greicielle André e Lucas Assoni, ambos me ajudaram muito no desenvolvimento desse projeto;
- Aos meus amigos que me apoiaram em todos os momentos.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa ao qual este trabalho esteve vinculado;

- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudo (CAPES-PROSUP).
- Aos membros da banca por terem aceitado o convite para avaliar este trabalho;

A todos vocês, o meu mais sincero “obrigada”!

Por isso não tema, pois estou com você; não tenha medo, pois sou o seu Deus. Eu o fortalecerei e o ajudarei; eu o segurarei com a minha mão direita vitoriosa.

Isaías 41:10

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é um patógeno importante responsável por altas taxas de mortalidade no mundo todo. As vacinas, atualmente em uso contra este patógeno, são baseadas em polissacarídeos capsulares e apresentam cobertura limitada e alto custo de produção, limitando seu uso nas regiões menos desenvolvidas. A proteína de superfície de pneumococo A (PspA) é um antígeno amplamente estudado como possível candidato vacinal contra infecções pneumocócicas, apresenta elevada imunogenicidade e confere proteção em diferentes modelos animais. Uma das ações descritas da PspA é a interação com a lactoferina humana, uma proteína de ação antimicrobiana que está presente no leite e outras secreções e quando ativada, libera peptídeos antimicrobianos (AMPs) chamados lactoferricinas que possuem ação lítica contra diversos patógenos. A presença de PspA protege a bactéria da ação lítica da lactoferrina. Um outro peptídeo com ação antimicrobiana semelhante é a indolicidina, uma molécula produzida por neutrófilos que possui amplo efeito antimicrobiano. O presente projeto teve como objetivo avaliar a susceptibilidade do *S. pneumoniae* à ação lítica da indolicidina, bem como o papel da proteína PspA neste mecanismo. Inicialmente foi determinada a susceptibilidade de pneumococos à ação da indolicidina. A fim de avaliar os efeitos de PspA sobre a ação lítica da indolicidina, bactérias selvagens e mutantes PspA negativos foram incubados na presença de doses pré-determinadas de indolicidina, e a sobrevivência foi comparada nos dois grupos. Em seguida, foi realizado um ensaio de competição pela adição de PspAs recombinantes aos pneumococos tratados com indolicidina. Por fim, o efeito de anticorpos anti-PspA na ação da indolicidina sobre o pneumococo foi avaliado pela adição de soro de camundongos imunizados com PspAs recombinantes ao ensaio. Observou-se que os pneumococos mutantes que não expressam PspA são mais sensíveis à ação da indolicidina do que as bactérias que expressam esta proteína. De forma semelhante, a adição de PspA recombinante reverteu parcialmente os efeitos tóxicos da indolicidina, possivelmente por sequestrar o peptídeo, impedindo sua ação lítica. De forma interessante, a adição de anticorpos anti-PspA foi capaz de ampliar os efeitos bactericidas da indolicidina sobre o pneumococo, sendo o efeito mais acentuado quando se utilizou anticorpos induzidos contra PspA homóloga àquela expressa na superfície bacteriana. Os dados deste projeto sugerem um mecanismo de defesa empregado pelo pneumococo durante as fases iniciais da infecção, bem como reforça o potencial de PspA como uma vacina eficaz contra esta bactéria.

Palavras chaves: *Streptococcus pneumoniae*. Proteína de superfície de pneumococo A. Indolicidina.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is an important pathogen responsible for high mortality rates worldwide. Vaccines used today against this pathogen are based on capsular polysacchariades and they show limited coverage and high production costs, which limit its use in less developed regions. The pneumococcal surface protein A is an antigen widely studied as a possible vaccine candidate against pneumococcal infections; it shows high immunogenicity and provides protection in different animal models. One of the actions described for PspA is the interaction with human lactoferrin, an antimicrobial protein found in milk and other secretions which releases antimicrobial peptides (AMPs) that have lytic action against various pathogens. The presence of PspA protects the bacterium from the lytic action of lactoferrin. Another peptide with similar antimicrobial action is indolicidin, a molecule produced by neutrophils which has wide antimicrobial effect. The present project intended to determine pneumococcal susceptibility to the lytic effects of indolicidin, as well as the role of the PspA protein in this mechanism. Initially, the susceptibility of pneumococci to the action of indolicidin was investigated. In order to evaluate the effects of PspA on the lytic action of indolicidin, wild type bacteria were compared to PspA negative mutants. Following, a competition assay using recombinant PspA was developed to determine if PspA can limit indolicidin action while in the soluble form. Finally, the effect of anti-PspA antibodies on indolicidin action was measured by adding anti-PspA antisera to the bacteria+indolicidin mixture. The data indicates that mutant pneumococci are more sensitive to lysis by indolicidin than bacteria expressing PspA, an effect similar to that observed with other AMPs, such as lactoferrin. Interestingly, the presence of anti-PspA antibodies enhanced the bactericidal effect of indolicidin over pneumococci, particularly when the antiserum was induced by a PspA molecule homologous to that expressed in the bacterial surface. The present results suggest a possible mechanism of immune evasion employed by pneumococci during the early stages of infection, and reinforces PspA's potential as an effective vaccine against this pathogen.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*. pneumococcal surface protein A. indolicidin

LISTA DE ABREVIACOES

AMPs	Peptídeos antimicrobianos
APD	Banco de dados de peptídeos antimicrobianos
BSA	Albumina do soro bovino
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CPS	Cpsula polissacarídica
D.O. _{600nm}	Densidade ptica = 600nm
OS	Fosfatidilserina
CL	Cardiolipina
PG	Fosfatidilglicerol
Trp	Triptofano
mL	Mililitro
LPS	lipopolissacarídeos
PspA	Proteína de superfície de pneumococo A
PspC	Proteína de superfície de pneumococo C
OMS	Organizao Mundial da Saúde
µg	Microgramas
µL	Microlitro
THY	Meio Todd Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura
mg/mL	Miligrama por mililitro
UFC/mL	Unidades formadoras de colnia por mililito
NaCl	Cloreto de sódio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
K ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico
µg/mL	Micrograma por mililitro
AS	Soluo de ensaio

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Representação esquemática de alguns mecanismos de ação dos AMPs ativos em membrana.....	17
FIGURA 2. Estrutura terciária da indolicidina.....	20
FIGURA 3. Distribuição das internações hospitalares por doenças pneumocócicas, segundo faixa etária, no SUS, no período de 2007 a 2017.....	23
FIGURA 4. Curva de crescimento D39 selvagem e mutante para o gene de PspA.....	34
FIGURA 5. Avaliação do número de UFCs de <i>Streptococcus pneumoniae</i> selvagem e mutante na D.O. _{600nm} = 0,4.....	35
FIGURA 6. Determinação da concentração da indolicidina capaz de reduzir a viabilidade de <i>Streptococcus pneumoniae</i> selvagem.....	36
FIGURA 7: Comparação da ação de indolicidina entre <i>S. pneumoniae</i> selvagem e mutante para o gene pspA.....	37
FIGURA 8. Efeito da adição de PspA recombinante sobre a ação lítica de indolicidina.....	40
FIGURA 9. Efeito dos anticorpos anti-PspA sobre a ação lítica de indolicidina na concentração de 15,62 µg/mL.....	41
FIGURA 10. Efeito dos anticorpos anti-PspA 1% (A) E 5% (B) sobre a ação lítica de indolicidina na concentração de 31,25 µg/mL.....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Estrutura primária da Indolicidina.....	19
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Peptídeos Antimicrobianos.....	13
1.2 Indolicidina.....	18
1.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	21
1.4 Proteína de superfície A (PspA) como candidato vacinal contra <i>S. pneumoniae</i>	25
2 OBJETIVO	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetos Específicos	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Determinação do padrão de crescimento de <i>S. pneumoniae</i> em cultivo	30
3.2 Determinação da concentração de indolicidina para utilização dos testes comparativos sobre <i>S. pneumoniae</i> in vitro.	30
3.3 Efeito de PspA sobre a ação lítica de indolicidina	31
3.3.1 Comparação da ação de indolicidina entre <i>S. pneumoniae</i> selvagem e mutante para o gene <i>pspA</i>	31
3.3.2 Efeito da adição de PspAs recombinantes sobre a ação lítica de indolicidina	32
3.4 Efeito dos anticorpos anti-PspA sobre a ação lítica de indolicidina.....	32
3.5 Análise estatística	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Determinação da curva de crescimento de <i>S. pneumoniae</i> in vitro.....	34
4.2 Determinação da concentração de indolicidina para utilização dos testes comparativos sobre <i>S. pneumoniae</i> in vitro	35
4.3 Comparação da ação de indolicidina entre <i>S. pneumoniae</i> selvagem e mutante para o gene <i>pspA</i>	36
4.4 Efeito da adição de PspA recombinante sobre a ação lítica de indolicidina	38
4.5 Efeito dos anticorpos anti-PspA sobre a ação lítica de indolicidina.....	41
5 CONCLUSÃO.....	46
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Peptídeos Antimicrobianos*

O aumento alarmante na resistência bacteriana aos antibióticos tem impulsionado a busca por alternativas terapêuticas que possam substituir os antibióticos convencionais ou ampliar seu potencial bactericida (OMS, 2018). Dentre as abordagens alternativas estão os probióticos, as ferramentas diagnósticas, as vacinas e os peptídeos antimicrobianos (ANVISA,2017).

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são moléculas naturais presentes em diversos organismos, onde fazem parte da resposta imune inata. Os peptídeos apresentam amplo espectro de atividade antimicrobiana, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (OMARDIEN; BRUL; ZAAT, 2016).

Os AMPs são oligopeptídeos com número variável (de cinco a mais de cem) de aminoácidos. Ao longo da história, os AMPs foram chamados de: peptídeos catiônicos de defesa do hospedeiro, peptídeos/proteínas antimicrobianos aniônicos, peptídeos anfipáticos catiônicos, AMPs catiônicos, peptídeos de defesa do hospedeiro e peptídeos antimicrobianos α -helicoidais (BAHAR; REN, 2013).

A identificação dos AMPs iniciou-se em estudos com plantas, e posteriormente foi constatada sua presença também em animais: na década de 1960, foram descritas a brobinina em rãs e a lactoferrina presente no leite de vaca. Nesse mesmo período foi comprovado que os leucócitos humanos contêm peptídeos antimicrobianos em seus lisossomos, sendo a lisozima a primeira proteína antimicrobiana humana relatada. Desde então, os AMPs foram amplamente caracterizados e descobertos em praticamente todos os organismos multicelulares que foram estudados para essa atividade (ZHANG; GALLO, 2016).

Com o aumento do número de AMPs descobertos anualmente, foi necessário criar um banco com o objetivo de auxiliar no gerenciamento de informações básicas sobre esses peptídeos. O primeiro banco de dados para AMPs foi publicado em 1998 e, desde então, tem sido continuamente aprimorado. A versão de 2004 de banco de dados de peptídeos antimicrobianos (APD) já continha 525 AMPs. Em 2009, foi atualizado para o APD2 com 1228 entradas. Desde a publicação do APD2, a base de dados aumentou exponencialmente. O APD3 (versão mais atual) inclui 2169 AMPs com ação

antimicrobiana registrados seguindo-se um conjunto de critérios definidos; além disso, novos recursos são adicionados ao banco de dados continuamente, objetivando uma maior eficácia no uso desse recurso (WANG; LI; WANG, 2016).

O efeito dos AMPs não se limita apenas contra microrganismos; também foram demonstradas funções antioxidante, na cicatrização de feridas e neutralização de toxinas (MANGONI; MCDERMOTT; ZASLOFF, 2016).

Os peptídeos com atividade antimicrobiana são encontrados em todas as formas de vida e constituem parte da defesa inata dos organismos (ZASLOFF, 2002). Seu tamanho pode variar entre 10 a 150 aminoácidos, com uma carga elétrica dentro de um intervalo de -3 até $+20$, o que é essencial para ligação com a célula alvo. A maioria dos AMPs são catiônicos e anfipáticos. Apesar de possuírem algumas diferenças na composição de aminoácidos (com predominância de aminoácido específicos, como prolina e triptofano) ou em sua estrutura (como presença ou não de α -hélices e pontes dissulfeto) apresentam elevada homologia (MARTIN et al., 2015).

Segundo o banco de dados de AMPs, existem mais de 2000 peptídeos com potencial antimicrobiano. Destes, 116 são produzidos em humanos, podendo ser encontrados em diferentes tecidos e superfícies epiteliais como pele, olhos, cavidade oral, auricular, intestino, sistema nervoso e urinário (WANG; LI; WANG, 2016).

Os AMPs naturais podem ser encontrados em bactérias, protozoários, fungos, plantas, insetos e animais. Nos animais, os AMPs são encontrados principalmente em órgãos e tecidos que estão expostos a patógenos transportados pelo ar. Acredita-se que os AMPs sejam a primeira linha de defesa imunológica inata contra vírus, fungos e bactérias. Devido esse fato, os AMPs desempenham um papel importante na proteção da maioria das infecções (COSTA et al., 2019).

A maioria dos AMPs são produzidos a todo momento por células específicas, porém, em alguns casos, a produção ocorre de forma indutiva. Uma pesquisa realizada por Hultmark et al., 1980, demonstrou que peptídeos antimicrobianos P9A e P9B podem ser induzidos a partir de infecção causada por *Enterobacter cloacae*. No estudo de Bals et al., 1999, foi verificado a produção de defensina após infecção causada por *Pseudomonas aeruginosa*. Sabe-se que a liberação de lipopolissacarídeos (LPS) pelas

bactérias pode induzir a produção de AMPs e, com isso, reduzir a resposta inflamatória (BAHAR; REN, 2013).

Diversos tipos de células tem a capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos, como células epiteliais no sistema gastrointestinal e geniturinário, fagócitos e linfócitos. Além do envolvimento direto na resposta imunológica os AMPs também influenciam na resposta inflamatória do hospedeiro durante o processo de infecção (PARK et al., 2001).

Com relação à estrutura, a maioria dos AMPs pode ser classificado em um de quatro grupos: folha β , α hélice, estendida e loop. As estruturas de α -hélice e folha β são mais comuns e peptídeos α -helicoidais são os AMPs mais estudados até hoje (OMARDIEN; BRUL; ZAAT, 2016).

A maioria dos AMPs têm como alvo a camada lipídica da membrana celular, que está presente em todos os microrganismos. Os AMPs com ação contra bactérias são, em grande parte, catiônicos e anfipáticos, apresentando uma região hidrofóbica e outra hidrofílica; essa estrutura permite aos AMPs a capacidade de ligação aos componentes lipídicos (região hidrofóbica) e aos grupos fosfolipídicos (região hidrofílica) presentes na membrana celular de bactérias, causando desintegração da estrutura da bicamada lipídica (KUPPUSAMY et al., 2019).

A carga positiva dos peptídeos antimicrobianos é crucial para sua atuação contra bactérias. Ao contrário das membranas plasmáticas de células eucarióticas – que são compostas por lipídeos neutros, as membranas citoplasmáticas das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas são ricas em lipídios altamente eletronegativos, como fosfatidilserina (PS), cardiolipina (CL) ou fosfatidilglicerol (PG). Essas estruturas conferem à membrana bacteriana uma carga negativa, que atrai peptídeos positivamente carregados. O ancoramento dos AMPs à membrana bacteriana leva à formação de poros, com consequente lise da célula microbiana (MAHLAPUU et al., 2016).

Além da sua carga positiva, os peptídeos antimicrobianos apresentam um elevado teor de resíduos hidrofóbicos, como o triptofano (Trp). A hidrofobicidade dos peptídeos é outra propriedade que influencia na atração em relação à membrana bacteriana, pois direciona a inserção do peptídeo na bicamada lipídica (REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004).

Os AMPs possuem três diferentes focos de ação: I- paredes celulares internas e externas, II- penetrando na célula alvo – com finalidade de se ligar em estruturas intrínsecas para o seu funcionamento ou III- penetrando células de defesa, onde exibem atividade imunomodulatória. Apesar da maioria dos AMPs agirem sobre a membrana, foi demonstrado que alguns AMPs, em baixas concentrações, podem matar bactérias sem desestabilizar a membrana. Neste caso, o mecanismo bactericida envolve a inibição de vias metabólicas essenciais à célula, como a replicação do DNA e a síntese de proteínas. Um exemplo de peptídeo que apresenta essa ação é a Buforin II, que apresenta capacidade de se difundir através da membrana celular sem danificá-la e se ligar ao DNA e ao RNA (BAHAR; REN, 2013).

Para realizar sua atividade antimicrobiana, os AMPs primeiramente interagem com a membrana, mesmo que o alvo final seja intracelular; a característica anfipática dos AMPs garante a interação eletrostática inicial com a membrana celular e, posteriormente, a inserção no interior da célula. O contato inicial dos AMPs com a membrana ocorre através da parte hidrofóbica dos peptídeos, seguido por interações iônicas e hidrofóbicas, as quais estão relacionadas a duas propriedades cruciais dos peptídeos: estado catiônico e hidrofobicidade (ZHANG; GALLO, 2016).

Os principais mecanismos de ação descritos dos AMPs são: I- Barril (do inglês *Barrel-stave*): As hastes são formadas primeiro paralelamente à membrana celular. Em seguida, os barris são formados, com a inserção dos AMPs perpendicularmente ao plano da bicamada lipídica; II- Carpete (do inglês *Carpet-like* ou *Detergent-like*): A micela peptídica toca a membrana primeiro e reveste uma pequena área da membrana; em seguida, as moléculas de AMP penetram na bicamada lipídica para permitir a formação de poros, deixando buracos para trás; III- Poro toroidal (do inglês *Toroidal pore*): Os AMPs alinham-se perpendicularmente à estrutura da bicamada com as suas regiões hidrofóbicas associadas à parte central da bicamada lipídica e as suas regiões hidrofílicas voltadas para o poro (KUPPUSAMY et al., 2019).

Os principais tipos de AMPs ativos na membrana e os mecanismos de suas ações estão exemplificados na Figura 1.

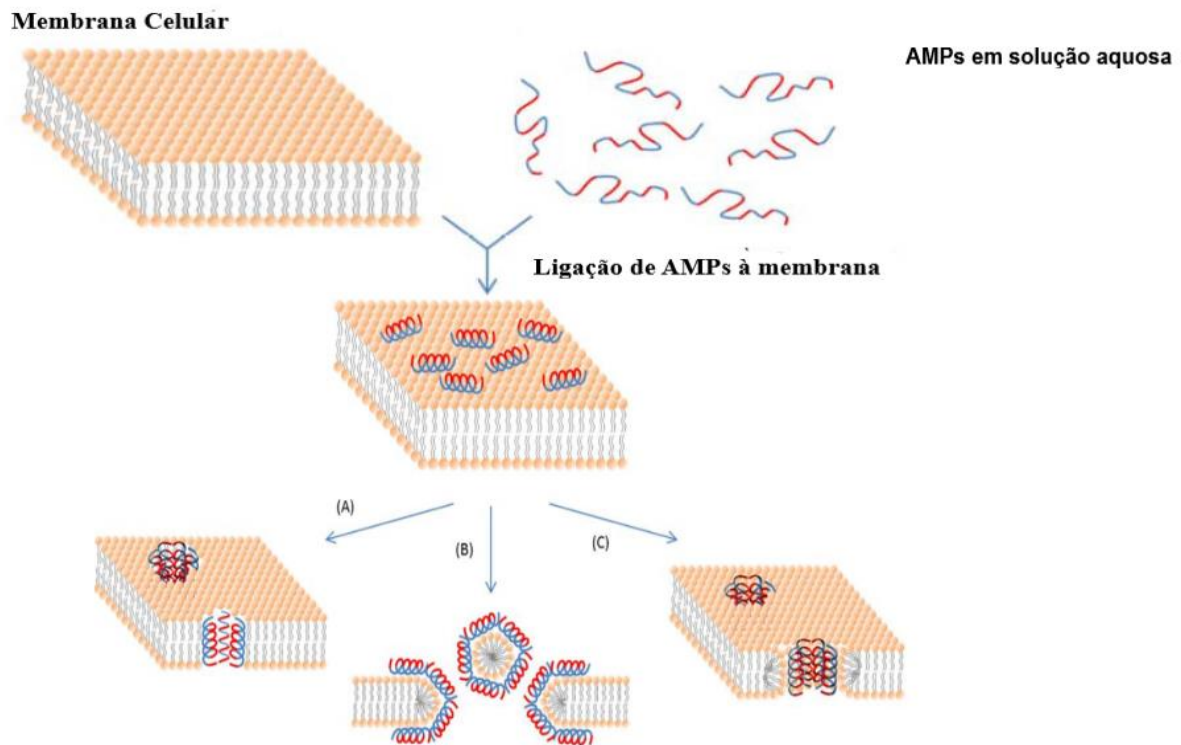


FIGURA 1. Representação esquemática de alguns mecanismos de ação dos AMPs ativos em membrana. (A) Modelo de Barrel-Stave: As moléculas de AMP se inserem na membrana perpendicularmente, formando uma estrutura em forma de barril; (B) modelo de tapete: Pequenas áreas da membrana são revestidas com moléculas de AMP com lados hidrofóbicos voltados para dentro, deixando os poros para trás na membrana; (C) modelo de poro toroidal: Este modelo se assemelha ao modelo de barris, mas os AMPs estão sempre em contato com a extremidade globular (cabeça) dos fosfolipídios da membrana. A cor azul representa as porções hidrofóbicas de AMPs, enquanto a cor vermelha representa as partes hidrofílicas dos AMPs. Fonte: Figura adaptada de BAHAR; REN (2013, pág. 6)

Uma característica marcante dos AMPs é o seu rápido efeito lítico; ao entrar em contato com a membrana celular, os peptídeos matam a célula microbiana em segundos. Outra característica observada é que os AMPs melhoram a atividade dos antibióticos através do efeito sinérgico (BAHAR; REN, 2013). A maioria dos AMPs são caracterizados não apenas como potentes antibióticos, mas também como moduladores eficazes de inflamação ou neutralizantes de toxinas patogênicas (ZHANG; GALLO, 2016).

Em bactérias Gram negativas, os AMPs tem a capacidade de penetração na camada de LPS, no qual se aproxima primeiramente do LPS através de forças eletrostáticas e após formam micelas. Ao formar micelas irá promover a desorganização do LPS permitindo que o peptídeo atravesse a membrana da bactéria exercendo seu efeito lítico (SHANG et al., 2016).

Foi evidenciado que AMPs podem ter a capacidade de matar bactérias resistentes a antibióticos. Em um estudo, *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina se mostrou sensível a nisina, um peptídeo com ação antimicrobiana semelhante à vancomicina, que age bloqueando a síntese de parede celular (BAHAR; REN, 2013).

As atividades imunomoduladoras dos AMPs incluem estimulação de quimiotaxia, modulação da diferenciação de células de defesa e iniciação da imunidade adaptativa, contribuindo em conjunto para a destruição bacteriana. AMPs também apresentam a capacidade de supressão de receptores tipo toll (TLR) e de induzir a produção de citocinas (MAHLAPUU et al., 2016).

Ainda existem alguns desafios em relação aos AMPs, como seu grau de toxicidade para humanos, sensibilidade a condições ambientais adversas (susceptibilidade a proteases e pH elevado), falta de seletividade contra algumas estirpes específicas, elevado custo para sua produção (BAHAR; REN, 2013). Porém, como os AMPs são formados por aminoácidos e apresentam tamanho reduzido, é relativamente fácil realizar modificações em sua estrutura, permitindo a obtenção de peptídeos sintéticos com maior potencial bactericida e maior estabilidade contra as proteases (WANG; LI; WANG, 2016).

A produção de AMPs trata-se de um mecanismo primário da imunidade na proteção contra bactérias. Praticamente todos os tecidos humanos são capazes de produzir AMPs, além disso, células sanguíneas como neutrófilo, eosinófilo e plaquetas também contém AMPs. Geralmente a ação dos AMPs ocorre em conjunto com outros mecanismos do sistema imune inato e adaptativo. O ação dos AMPs é crucial para eliminação de bactérias sendo o mecanismo mais comum da imunidade (WIESNER; VILCINSKAS, 2010).

1.2 Indolicidina

A indolicidina foi primeiramente isolada a partir de neutrófilos bovinos. É um peptídeo antimicrobiano pertencente à família das catelicidinas, assim como outro peptídeo, LL-37. Após a passagem por neutrófilos, as catelicidinas são transformadas em

peptídeos ativos (BRAFF et al.,2005), que apresentam atividade contra bactérias, fungos, vírus e células cancerígenas, além de uma possível atividade quimiotática para células de defesa como neutrófilos, monócitos e linfócitos T (VEGH et al., 2011).

A indolicidina é composta por 13 resíduos de aminoácidos, dos quais cinco são triptofano, o que faz com que ela pertença ao grupo de peptídeos ricos em um determinado tipo de aminoácido (Tabela 1). Em pH fisiológico, a indolicidina possui 4 cargas positivas (N-terminal, Lys⁵, Arg¹² e Arg¹³) e um grupo C-terminal amidado sem carga negativa nessa região. Durante a amidação, ocorre a perda do grupamento –OH da carboxila terminal (-COOH), que é substituído por um grupamento amina (-NH). Esse processo confere um caráter mais positivo à molécula (NAN et al., 2009).

TABELA 1. Estrutura primária da Indolicidina. Fonte: Tabela modificada de Fuzo (2009, p.15).

Peptídeo	Estrutura primária	Carga	PDB**
IND	<u>I</u> le ¹ -Leu ² -Pro ³ -Trp ⁴ - <u>L</u> ys ⁵ -Trp ⁶ -Pro ⁷ -Trp ⁸ -Trp ⁹ -Pro ¹⁰ -Trp ¹¹ - <u>A</u> rg ¹² - <u>A</u> rg ¹³ -NH ₂	+4	1G89

** Código do peptídeo no Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>).

A região C-terminal da indolicidina é responsável pelo potencial antimicrobiano. Apresenta variações em sua estrutura, enquanto a porção N-terminal é idêntica aos seus precursores (Figura 2). Ao contrário de outros peptídeos, a indolicidina não possui α -hélices ou estruturas β , estando disposta linearmente. O tamanho reduzido e ausência de estrutura secundária fazem da indolicidina um peptídeo de síntese simples, o que corrobora seu potencial terapêutico (FRIEDRICH et al., 2001; ROZEK; FRIEDRICH; HANCOCK, 2000).

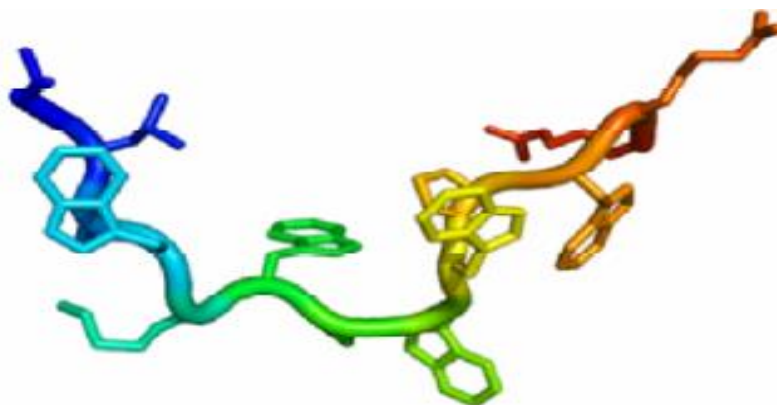


FIGURA 2: Estrutura terciária da indolicidina. São mostradas as cadeias laterais e a cadeia principal. O resíduo azul representa a região N-terminal, e o vermelho, a porção C-terminal. Fonte: Figura adaptada de: FUZO (2009, pág 16).

A maneira pela qual peptídeos catiônicos interagem com a membrana é através da alteração da permeabilidade da membrana que pode ocasionar ruptura da mesma. Esse mecanismo de perturbar a membrana celular é comum à maioria dos AMPs. A capacidade dos AMPs catiônicos em permeabilizar a membrana é devida à interação de resíduos de arginina com os grupamentos de fosfolípidos localizados do lado oposto da membrana. Esse mecanismo foi confirmado através de ressonância magnética, demonstrando que a indolicidina apresenta a capacidade de permeabilização da membrana lipídica (ROKITSKAYA et al., 2011). No entanto, a alta concentração de resíduos de prolina e triptofano faz com que a indolicidina seja um antimicrobiano único. Diferente de outros peptídeos, a estrutura da indolicidina ao interagir com a membrana não é uma hélice bem definida. Observou-se que a atividade antimicrobiana da indolicidina ocorre através da formação de poros na membrana celular, podendo ou não causar desintegração total das estruturas da membrana. Quando comparado com peptídeos antimicrobianos α -helicoidais, a indolicidina apresenta menor capacidade de se dissipar pela membrana interna das bactérias e os poros formados são menores, porém a morte das bactérias pela indolicidina é extremamente rápida (VEGH et al., 2011).

Estudos utilizando lipossomas também revelaram a capacidade da indolicidina agir através da ativação de bombas de efluxo, induzindo o efluxo de metabólitos aniônicos essenciais para a célula (ROKITSKAYA et al., 2011).

A indolicidina apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e protozoários. Em bactérias Gram-negativas, foi demonstrado que a

indolicidina é capaz de permear rapidamente a parede celular, atingindo o alvo de ação, a membrana plasmática, onde forma canais que levam à sua ruptura (FALLA; KARUNARATNE; HANCOCK, 1996; GALDIERO et al., 2016). Um efeito semelhante foi observado em *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (bactérias Gram-positivas), sugerindo que a indolicidina é capaz de atravessar a espessa barreira da parede celular e promover a desestabilização da membrana plasmática. Também foi demonstrado que a indolicidina tem a capacidade se ligar à dupla hélice do DNA, impedindo a replicação e a transcrição, e amplificando sua ação antimicrobiana (GHOSH et al., 2014; JINDAL et al., 2015). Assim, é concebível que a indolicidina use suas propriedades de ligação à membrana para entrar no citoplasma e exercer sua atividade antimicrobiana atacando outros alvos além da membrana (EBBENSGAARD et al., 2015).

Estudos demonstraram que a indolicidina apresentam ação contra o pneumococo, atuando sobre a parede celular/membrana plasmática dessa bactéria. Esse é o principal mecanismo utilizado pela maioria dos peptídeos, não sendo exclusivamente uma ação da indolicidina. A quebra da parede celular bacteriana resulta da interação entre a membrana carregada negativamente e a indolicidina com carga positiva, conteúdo hidrofóbico e alta concentração de triptofano (JINDAL et al., 2015; JINDAL et al., 2017).

A despeito de seu elevado potencial antimicrobiano, a indolicidina em sua forma nativa apresenta toxicidade contra eritrócitos (AHMAD et al., 1995) e linfócitos T (EBBENSGAARD et al., 2015; SCHLUESENER et al., 1993). Este efeito pode ser reduzido, sem perder a atividade antimicrobiana, por meio de diferentes métodos como a substituição dos resíduos de lisina por prolina, troca da posição do resíduo de triptofano presente na porção hidrofóbica da hélice anfipática ou por meio de ciclagem. Dessa forma, diferentes compostos derivados da indolicidina, com a propriedade antimicrobiana mantida ou melhorada, e com redução da citotoxicidade, tem sido investigados como alternativas para as possíveis limitações da indolicidina (JINDAL et al., 2017; ROZEK; FRIEDRICH; HANCOCK, 2000; SUBBALAKSHMI et al., 1996).

1.3 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é uma bactéria que coloniza o trato respiratório humano em um processo assintomático e pode, sob certas condições como coinfeção pelo vírus influenza ou deficiência nos mecanismos de defesa (BEITER et al.,

2008), desencadear infecção em outros locais, tais como os pulmões, meninges e sangue, provocando reações inflamatórias intensas e levando a doenças como a pneumonia, meningite e septicemia (JINDAL et al., 2015).

Em 2008 um levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) mostrou que, dentre 8,8 milhões de mortes causadas por doenças pneumocócicas, 476.000 eram crianças menores de cinco anos. O pneumococo é uma das principais bactérias que causam morbidade e mortalidade em todo mundo, apresentando grande relevância em saúde pública. A incidência e mortalidade de infecções causadas por essa bactéria são maiores entre os idosos e crianças. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 1,6 milhões de pessoas morrem todo o ano no mundo devido a doenças pneumocócicas. A incidência e mortalidade de infecções causadas por essa bactéria são maiores entre os idosos e crianças (ANVISA,2018).

A transmissão do *S. pneumoniae* ocorre através de contato entre pessoas que estão com a doença ou que estão apenas colonizadas pela bactéria, mas sem sintomas. A bactéria é transmitida através de gotículas de saliva e/ou muco. Os pneumococos podem causar doença invasiva – de maior gravidade, como pneumonia, bacteremia, meningite e endocardite – e doença pneumocócica não invasiva – apresenta menor gravidade, como otite aguda, sinusite, bronquite, entre outras doenças. A disseminação das doenças pneumocócicas varia conforme a faixa etária, porém a pneumonia é sempre a mais presente em todas as idades. Um levantamento realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) mostra a distribuição das internações hospitalares por doenças pneumocócicas, segundo faixa etária, no SUS, no período de 2007 a 2017 (ANVISA, 2018) (Figura 3).

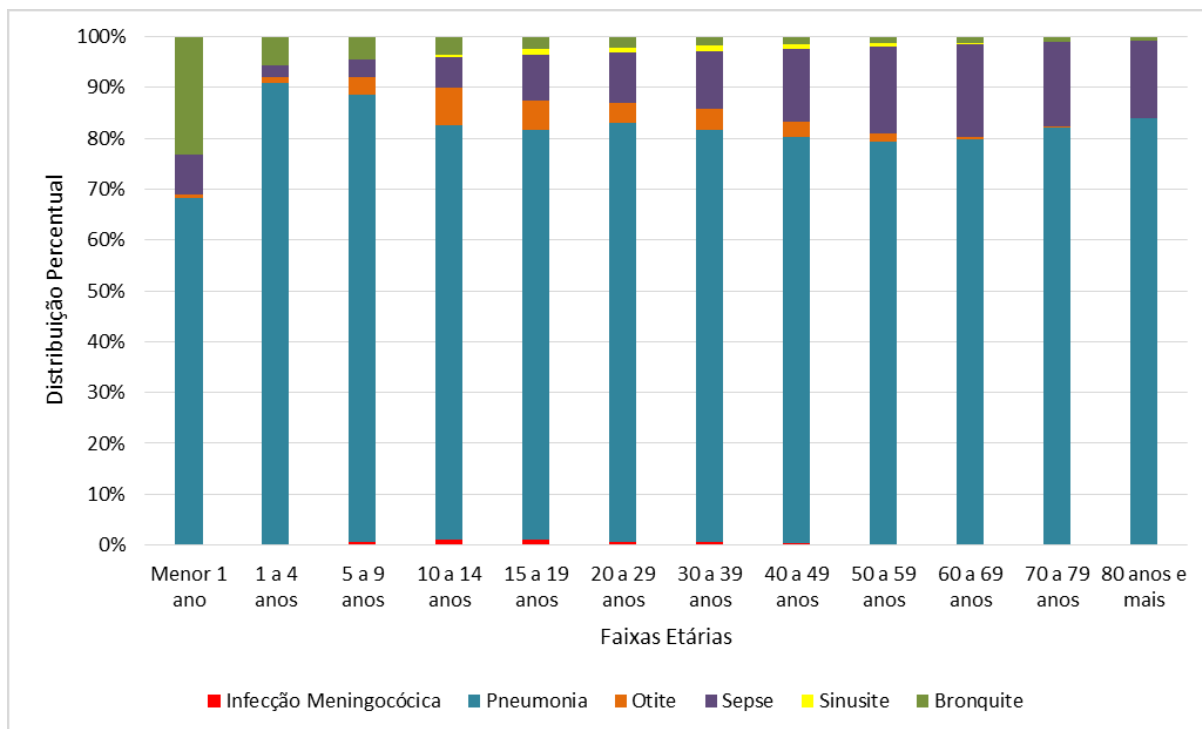


FIGURA 3. Distribuição das internações hospitalares por doenças pneumocócicas, segundo faixa etária, no SUS, no período de 2007 a 2017. Fonte: Figura adaptada ANVISA (2018, pág. 9)

S. pneumoniae é um diplococo Gram-positivo encapsulado, α -hemolítico e catalase-negativo. É uma bactéria extracelular, com capacidade de se replicar na circulação, nos tecidos conjuntivos e em espaços teciduais, tais como os lumens das vias aéreas (MARRIOTT; DOCKRELL, 2006).

O pneumococo apresenta sua superfície constituída de três estruturas: membrana plasmática, que apresenta estrutura conservada, com moléculas de ácido lipoteicóico; parede celular constituída de polissacarídeos e ácido teicóico, que apresenta diversas proteínas de superfície; e a cápsula polissacarídica, apresentando entre 200-400 nm de espessura e uma estrutura química diversificada (DAWSON, 2004; KADIOGLU et al., 2008).

O epitélio das vias aéreas apresenta mecanismos para tentar impedir as infecções causadas por pneumococo, incluindo a formação de muco (barreira física que dificulta a fixação da bactéria ao epitélio) e a ação de proteínas antimicrobianas que estão presentes na mucosa e são essenciais para o funcionamento do sistema imune inato desse nicho (PARKER; PRINCE, 2011).

A cápsula polissacarídica (CPS) é um fator de virulência importante, envolvido na evasão da deposição de proteínas do Sistema Complemento e consequente fagocitose,

durante a invasão do hospedeiro humano. Por sua variabilidade estrutural, a composição da cápsula é utilizada como critério de classificação da bactéria em 97 sorotipos (WEN et al., 2016). Os polissacarídeos capsulares são imunogênicos, e constituem a base das vacinas pneumocócicas atualmente em uso. No entanto, sua elevada variabilidade, aliada a limitações técnicas na produção das vacinas reduzem a cobertura vacinal (BONTEN et al., 2015).

Durante as últimas décadas, tem sido observado um aumento na resistência do pneumococo aos antibióticos; a disseminação mundial da resistência a medicamentos entre patógenos respiratórios mais comuns, incluindo *S. pneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis*, foi considerada epidêmica (VENTOLA, 2015a).

As infecções causadas pelo pneumococo são graves e muitas vezes fatais. O desenvolvimento de resistência aos antibióticos utilizados para o tratamento complica ainda mais o quadro do paciente e o médico passa a não ter opções de medicamento para o tratamento. A bactéria desenvolveu resistência a penicilinas e eritromicinas (que são os antimicrobianos mais utilizadas para esse tipo de infecção) além de medicamentos menos utilizados, como sulfametoxazol com trimetoprima, e tetraciclina. Atualmente, cerca de 30% dos casos graves de infecção causada por essa bactéria são resistentes a um ou mais antibióticos clinicamente relevantes (VENTOLA, 2015b).

As altas taxas de mortalidade e morbidade de infecções causadas por pneumococo, juntamente com aumento de cepas resistentes aos antibióticos, incentivam as pesquisas de novas estratégias para prevenção das infecções por *S. pneumoniae* (BRAIDO et al., 2008). As vacinas pneumocócicas usadas atualmente são baseadas em polissacarídeos isolados ou fusionadas a proteínas carreadoras, e fornecem proteção contra doença invasiva causada por sorotipos capsulares incluídos em suas formulações. No entanto, devido à elevada variabilidade dos sorotipos capsulares (há mais de 95 sorotipos descritos), e ausência de proteção cruzada, as vacinas atuais não protegem contra sorotipos não incluídos na formulação. Além disso, a redução da circulação de pneumococos dos sorotipos vacinais – resultante do sucesso da vacina contra esses isolados – tem levado ao aumento na prevalência de sorotipos não vacinais, e conseqüente perda da eficácia vacinal. Por fim, os custos elevados de produção das vacinas conjugadas restringem seu uso nos países mais pobres, que são também os mais afetados pelas

doenças pneumocócicas (BRAIDO et al., 2008; DARRIEUX et al., 2015; TARAHOMJOO, 2014).

As limitações das vacinas polissacarídicas tem impulsionado a busca por novas formulações, capazes de proteger contra todos os sorotipos capsulares de pneumococo. Neste cenário, antígenos proteicos apresentam-se como uma alternativa interessante, por seu elevado grau de conservação entre isolados clínicos e seu papel em eventos cruciais da patogênese bacteriana (DARRIEUX et al., 2015). Entre as proteínas mais estudadas como possíveis candidatos vacinais contra o pneumococo, está a proteína de superfície de pneumococo A (PspA), descrita a seguir (KHAN; VIDAL; et al., 2018).

1.4 Proteína de superfície A (PspA) como candidato vacinal contra *S. pneumoniae*

Além da cápsula, diversas proteínas de superfície do pneumococo também são fatores de virulência, que ajudam na proteção da bactéria contra a defesa do hospedeiro. A proteína de superfície A (PspA) é um fator de virulência exposto, com sorologia variável e presente em todos os isolados de *S. pneumoniae*. Sua massa molecular varia entre 67 a 99 KDa (DAWSON, 2004; REN et al., 2004a).

PspA apresenta quatro domínios principais em sua estrutura: 1- Domínio N-terminal com carga negativa, rico em alfa-hélice, sendo a porção funcional da PspA que se projeta para fora da cápsula; 2- Região rica em prolina; 3- Domínio de ligação à colina consistindo em 20 repetições de aminoácidos, responsável pela fixação da proteína à parede celular do pneumococo; 4- Região C terminal com caráter hidrofóbico, que não está envolvida no ancoramento da proteína (KHAN; KHAN; et al., 2018). A região N-terminal é a mais imunogênica, e é a região utilizada nas formulações vacinais que incluem esta proteína (KHAN; VIDAL; et al., 2018). Também é a região utilizada neste trabalho.

A sequência de aminoácidos da região N-terminal é dividida em duas outras regiões chamadas A e B, sendo que a B, conhecida como “região definidora de clado” (CDR), apresenta um padrão de variação mais estável, utilizado como base para classificação da PspA em 3 famílias, subdivididas em 6 clados, de acordo com o grau de identidade (MCDANIEL et al., 2004). A família 1 inclui os clados 1 e 2; a família 2 é constituída pelas clados 3, 4 e 5, e a família 3 inclui as moléculas de clado 6. As PspA são

consideradas da mesma família quando a região definidora de clado apresenta semelhança maior que 45%, e quando são do mesmo clado, a semelhança é superior a 80%. As PspAs das famílias 1 e 2 (em particular as moléculas de clados 1 a 4) são predominantes no mundo todo, estando presentes em mais de 95% dos isolados clinicamente relevantes da bactéria (HOLLINGSHEAD et al., 2000).

A presença de PspA reduz a deposição de proteínas do Sistema Complemento – um importante mecanismo de eliminação da bactéria pelo hospedeiro – na superfície bacteriana, limitando seu reconhecimento e eliminação por fagócitos (DARRIEUX et al., 2007; DARRIEUX et al., 2008; REN et al., 2012). Uma pesquisa utilizando *S. pneumoniae* mutante para gene de PspA, mostrou que a proteína é fundamental para virulência da bactéria; a bactéria mutante apresentou uma ativação maior do sistema complemento no soro de camundongos quando comparado com a resposta da bactéria selvagem (PspA positiva) e foi eliminada da circulação de forma mais rápida (REN et al., 2004).

Em humanos, a infecção por pneumococo induz a produção de anticorpos anti-PspA, indicando que esta proteína é expressa durante o curso da infecção. De forma semelhante, PspA nativa e fragmentos recombinantes incluindo a região aminoterminal da molécula são altamente imunogênicos, induzindo elevada produção de anticorpos específicos em camundongos, coelhos e chinchilas (KONG et al., 2013; SCHACHERN et al., 2014; KOTHARI et al., 2015). Também se observa produção de citocinas como IL-1 e IL-6 no baço e pulmão de animais vacinados com PspA, manuscrito em preparação. A imunização de camundongos com PspA confere proteção contra sepse, pneumonia e, na presença de adjuvantes de mucosa, contra colonização. PspA também se mostrou protetora contra otite média em chinchilas (SCHACHERN et al., 2014). Além do seu potencial protetor comprovado em modelos animais, PspA já foi utilizada em ensaio clínico de fase I (BRILES et al., 2000c; SWIATLO e WARE, 2003; BRILES et al., 2004).

Apesar de seu elevado potencial como candidato a uma vacina proteica contra o pneumococo, a variabilidade estrutural de PspA torna necessária a inclusão de mais de uma molécula, a fim de garantir uma maior cobertura vacinal. Estudos investigando a reatividade cruzada entre PspAs sugerem que ao menos uma molécula da família 1 e uma da família 2 devem ser incluídas na vacina para garantir proteção contra um maior número de isolados de pneumococo (CONVERSO et al., 2017; GOULART et al., 2011).

A imunização com PspA induz elevada produção de anticorpos IgG, que promovem a ativação da via clássica do sistema complemento, causando um aumento na deposição de C3b e promovendo a opsonofagocitose da bactéria (REN et al.; 2004b, DARRIEUX et al., 2008). Este efeito é amplificado pela ativação da via alternativa do sistema complemento, pois os anticorpos anti-PspA bloqueiam os efeitos inibitórios da proteína sobre este sistema (REN et al.; 2004b, DARRIEUX et al., 2008).

Além da interação com o sistema complemento, foi demonstrado que PspA se liga à lactoferrina, uma proteína com ação antimicrobiana, presente no leite e secreções mucosas. A lactoferrina é um importante componente da imunidade inata, e desempenha diversas funções, como imunomodulação, atividade anticarcinogênica e ação antimicrobiana (SIQUEIRA-CENDON et al., 2014; ROSA et al., 2017). Nas mucosas, a lactoferrina atua sequestrando ferro; a baixa disponibilidade deste íon metálico na forma livre promove um efeito bacteriostático, limitando a colonização deste nicho. A forma livre de ferro, conhecida como apolactoferrina, apresenta efeito lítico sobre diversos tipos de microrganismo. Quando ativada, a apolactoferrina sofre proteólise, liberando peptídeos catiônicos (lactoferrinas) que levam à lise de microrganismos (DARRIEUX et al., 2007; DARRIEUX et al., 2008; REN et al., 2012).

Foi verificado que a presença de PspA na superfície bacteriana inibe a ação lítica da lactoferrina protegendo, assim, a bactéria (HAMMERSCHMIDT et al., 1999; MIRZA et al., 2011). Foi demonstrado ainda que a presença de anticorpos anti-PspA potencializa o efeito bactericida da lactoferrina sobre *S. pneumoniae* (ANDRE et al., 2015; HAMMERSCHMIDT et al., 1999; MIRZA et al., 2011).

Uma vez que indolicidina e lactoferrina possuem mecanismos de ação semelhantes, que ambos são peptídeos com carga positiva que se inserem na membrana e causam lise, o presente projeto tem por objetivo avaliar a hipótese de que o papel protetor de PspA para pneumococo não se limita à ação da lactoferrina, mas inclui outros peptídeos catiônicos de ação lítica, como a indolicidina. Uma vez que esse peptídeo também faz parte da nossa defesa imune é fundamental que ele esteja disponível para exercer sua função contra o pneumococo; dessa forma, a imunização com PspA poderia induzir a produção de anticorpos capazes de facilitar a ação da indolicidina na eliminação do patógeno. Para testar esta hipótese, foi determinada a susceptibilidade do pneumococo selvagem e mutante negativo de PspA à ação da indolicidina *in vitro*; o papel de PspA

livre neste mecanismo foi investigado através da adição de proteínas recombinantes para analisar se existe interação com a indolicidina e também a adição de anticorpos anti-PspA para verificar se o bloqueio da proteína de superfície facilita a ação lítica da indolicidina.

2 OBJETIVO

2.1 *Objetivo Geral*

O presente projeto tem como objetivo avaliar a susceptibilidade de *S. pneumoniae* à ação lítica da indolicidina, e investigar o papel da proteína de superfície A de pneumococo (PspA) neste mecanismo.

2.2 *Objetos Específicos*

- 1.** Determinar a concentração da indolicidina capaz de inibir o crescimento de *S. pneumoniae*;
- 2.** Comparar a ação da indolicidina sobre cepas de *S. pneumoniae* selvagem e mutante para o gene *pspA*;
- 3.** Avaliar os efeitos da adição da proteína PspA recombinante purificada na ação da indolicidina sobre *S. pneumoniae*;
- 4.** Investigar o papel de anticorpos anti-PspA na morte de *S. pneumoniae* na presença da indolicidina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Determinação do padrão de crescimento de S. pneumoniae em cultivo*

Para a determinação do padrão de crescimento foram utilizadas estirpes de *S. pneumoniae* D39 selvagem e mutante para gene de *pspA* JY53, gentilmente cedidas pelo Dr Anders Hakansson, da Universidade de Lund, Suécia. O mutante foi obtido pela técnica de mutagênese de inativação por inserção (do inglês *insertion inactivation mutagenesis*). Nesta técnica, o gene alvo é inativado pela inserção de um gene de resistência a eritromicina em sua sequência codificante (McDANIEL et al., 1987). Estoques bacteriano preservados a -80 °C em glicerol foram descongelados no gelo, plaqueados em ágar sangue (10 µL/placa) e cultivados a 37 °C em anaerobiose por 18-24 horas. Após o tempo de incubação, as colônias foram transferidas para 5 mL de meio Todd Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura (THY) e cultivadas até durante 10 horas. O crescimento bacteriano foi aferido a cada hora de cultivo, pela medida da absorbância através do equipamento GeneQuant™ pro disponível no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Microrganismos. Para cada densidade verificada foi feita a diluição seriada e plaqueado em ágar sangue para quantificar as bactérias viáveis (UFC/mL).

3.2 *Determinação da concentração de indolicidina para utilização dos testes comparativos sobre S. pneumoniae in vitro.*

Para determinação das concentrações de indolicidina que foram utilizadas nos experimentos seguimos o protocolo de (JINDAL et al., 2015 e 2017) e adaptado por nosso grupo (ANDRE et al., 2015). A indolicidina utilizada foi da marca Sigma na concentração inicial de 0,5 mg/mL. A estipe D39 de *S. pneumoniae* selvagem, mantida a -80 °C, foi descongelada, plaqueada em ágar sangue cultivada em estufa a 37 °C em jarra de anaerobiose por 18-24 horas. Após o tempo de incubação, as colônias foram transferidas para 5 mL de meio THY e cultivadas a 37 °C. A absorbância dos cultivos foi aferida em intervalos de uma hora, a partir da $D.O_{600nm} = 0,1$ até atingir a fase mid log de crescimento, equivalente à $D.O_{600nm} = 0,4$. Ao atingir a absorbância desejada, retirou-se 1 mL da amostra e centrifugou-se por 5 minutos a 8000 rpm no equipamento Centrifuge 5418 (Eppendorf). Em seguida, retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 1 mL de solução de ensaio (AS) contendo 50 µM de cloreto de cálcio $CaCl_2$, 150 mM de NaCl, 1 mM de $MgCl_2$ e 1 mM de K_2PO_4 . Após nova centrifugação, foi realizada uma segunda lavagem com AS. Alíquotas de 12,5 µL da suspensão bacteriana foram incubadas durante uma hora a 37 °C na presença de diferentes concentrações de indolicidina (125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,62 µg/mL; 7,81 µg/mL), enquanto

o grupo controle foi incubado apenas com AS. Diluições em série de cada amostra foram plaqueadas em ágar sangue, incubou-se em anaerobiose de 18-24 horas a 37 °C para contagem das colônias bacterianas sobreviventes ao tratamento. A análise do efeito lítico foi realizada pela comparação do número de bactérias entre o grupo tratado com indolicidina e o grupo controle, incubado somente com PBS. Todo o experimento foi realizado em duplicata, e repetido duas vezes para confirmação dos resultados.

3.3 Efeito de PspA sobre a ação lítica de indolicidina

3.3.1 Comparação da ação de indolicidina entre *S. pneumoniae* selvagem e mutante para o gene *pspA*

Após a padronização das concentrações definidas no ítem 3.2, para avaliar a contribuição da proteína PspA para a ação lítica da indolicidina sobre os pneumococos, cepas bacterianas selvagem e mutante para o gene *pspA* foram submetidas ao tratamento com indolicidina em diferentes concentrações.

As estirpes D39 de *S. pneumoniae* selvagem e mutante para o gene de *pspA*, foram retiradas do - 80 °C e, após o descongelamento, plaqueadas em ágar sangue. Em seguida incubou-se em estufa a 37 °C em jarra de anaerobiose por 18-24 horas. Após o tempo de incubação cultivou-se as amostras em meio 5 mL THY e acompanhou-se a absorbância, a partir da D.O._{600nm}= 0,1 até atingir a fase mid log de crescimento, equivalente à D.O._{600nm}= 0,4. Ao atingir a absorbância desejada, retirou-se 1 mL da amostra e centrifugou-se por 5 minutos a 8000 rpm. Após centrifugação retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet com 1 mL de solução de ensaio (AS). Após nova centrifugação, foi realizada uma segunda lavagem com AS. Foram montados quatro grupos: 1- Controle bactéria selvagem; 2- Bactéria selvagem+ indolicidina; 3- Controle bactéria mutante; 4- Bactéria mutante+indolicidina. Para cada grupo foi pipetado alíquotas de 12,5 µL da respectiva suspensão bacteriana e após incubadas durante uma hora a 37 °C na presença de diferentes concentrações de indolicidina (31,25 µg/mL/15,62 µg/mL/7,81 µg/mL/3,90 µg/mL), o grupo controle não foi submetido ao tratamento com indolicidina. Diluições em série de cada amostra foram plaqueadas em ágar sangue, incubou-se em anaerobiose de 18-24 horas a 37 °C para contagem das colônias bacterianas sobreviventes ao tratamento. A análise do efeito lítico foi realizada pela comparação do número de bactérias entre o grupo tratado com indolicidina e o grupo controle, incubado com PBS. A comparação dos efeitos da indolicidina sobre a bactéria selvagem e mutante PspA-negativo também foi

realizada. Todo o experimento foi realizado em duplicata, e repetido duas vezes para confirmação dos resultados.

3.3.2 Efeito da adição de PspAs recombinantes sobre a ação lítica de indolicidina

Para avaliar o efeito da adição de PspA recombinante na ação bactericida da indolicidina sobre o pneumococo, foi utilizado o mesmo protocolo descrito no item 3.3.1, porém adicionando às amostras 10 µg/mL de PspA recombinante. Foram utilizados dois fragmentos incluindo a porção N-terminal mais a região rica em prolinas de PspAs de família 1: PspA 278 e PspA P339 (GOULART et al., 2011). Estas duas moléculas foram selecionadas por apresentarem elevada reatividade cruzada dentro da família 1 (a mesma família da cepa D39 utilizada neste estudo), e produzidas de forma recombinante em *E. coli*. Os fragmentos codificantes da região N-terminal das moléculas foram clonados em vetor pQE30 (Qiagen) e expressos em *E. coli* M15 pela indução dos cultivos com 1mM IPTG durante 3 hs. As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade ao Níquel e armazenadas a -20 °C.

A concentração de indolicidina neste experimento foi de 15,62 µg/mL. Foram montados 5 grupos: 1-Bactéria selvagem incubada somente com solução AS; 2- Bactéria selvagem+indolicidina; 3- Bactéria selvagem+indolicidina+BSA; 4- Bactéria selvagem+indolicidina+PspA 278; 5- Bactéria selvagem+indolicidina+ PspA P339. O grupo tratado com BSA (albumina do soro bovino) foi utilizado como controle de ligação inespecífica, na concentração de 10 µg/mL.

3.4 Efeito dos anticorpos anti-PspA sobre a ação lítica de indolicidina

A fim de determinar a capacidade dos anticorpos anti-*pspA* de bloquear uma possível ação protetora da proteína contra os efeitos da indolicidina em pneumococos selvagens, foi utilizado o mesmo protocolo descrito no item 3.3.1, porém foram incubados na presença de 1% e 5% de soro de camundongos imunizados com PspA (obtido no projeto de mestrado da aluna Greiciely Andre, parecer do comitê de ética número Protocolo 001.09.2014 IP.CIUCA:200.225.122.34) ou soro controle (de animais imunizados apenas com o adjuvante). Os soros anti-PspA utilizados neste estudo foram α -245 (PspA família 1 e clado 1) e α -94 (PspA família1 e clado 2).

α -94 (PspA família1/clado 2), e foram produzidos pela imunização de camundongos com PspAs com alta reatividade cruzada dentro da família 1 (Goulart et al 2011). As concentração de indolicidina utilizada foi de 15,62 µg/mL e 31,25 µg/mL. O número de bactérias sobreviventes foi calculado e comparado ao grupo tratado com soro controle.

Foram montados dois grupos, primeiro grupo concentração de indolicidina de 15,62 µg/mL: Indolicidina+ soro salina 1% e 5%, Indolicidina+ α -245 1% e 5%; Indolicidina+ α -94 1% e 5%. Segundo grupo concentração de indolicidina de 31,25 µg/mL: : Indolicidina+ soro salina 1% e 5%, Indolicidina+ α -245 1% e 5%; Indolicidina+ α -94 1% e 5%. O grupo de soro salina é controle de ligação inespecífica.

3.5 *Análise estatística*

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos duas vezes. Para avaliação da ação da indolicidina sobre pneumococos selvagens e mutantes, foram utilizados o teste ANOVA e o teste t de student (não pareado, *one-tailed*). Foram consideradas significativas diferenças com $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da curva de crescimento de *S. pneumoniae* in vitro

Inicialmente, foi realizado cultivo da estirpe de *S. pneumoniae* selvagem D39, e do mutante para o gene *pspA* JY53. A Figura 4 mostra as medidas de absorvância da amostra de *S. pneumoniae* selvagem e *S. pneumoniae* mutante para o gene de *pspA* cultivadas em THY durante 10 horas. Pode-se observar que as duas cepas apresentaram um crescimento semelhante até 6 horas de cultivo ($D.O_{600nm}=0,4$), a partir de 6 horas, a cepa selvagem apresentou um crescimento mais acentuado, tendo atingido a $D.O_{600nm}=0,8$ após 8 horas de cultivo, com declínio posterior. Após 10 horas de cultivo, as duas cepas voltaram a apresentar medidas semelhantes ($D.O_{600nm}=0,6$).

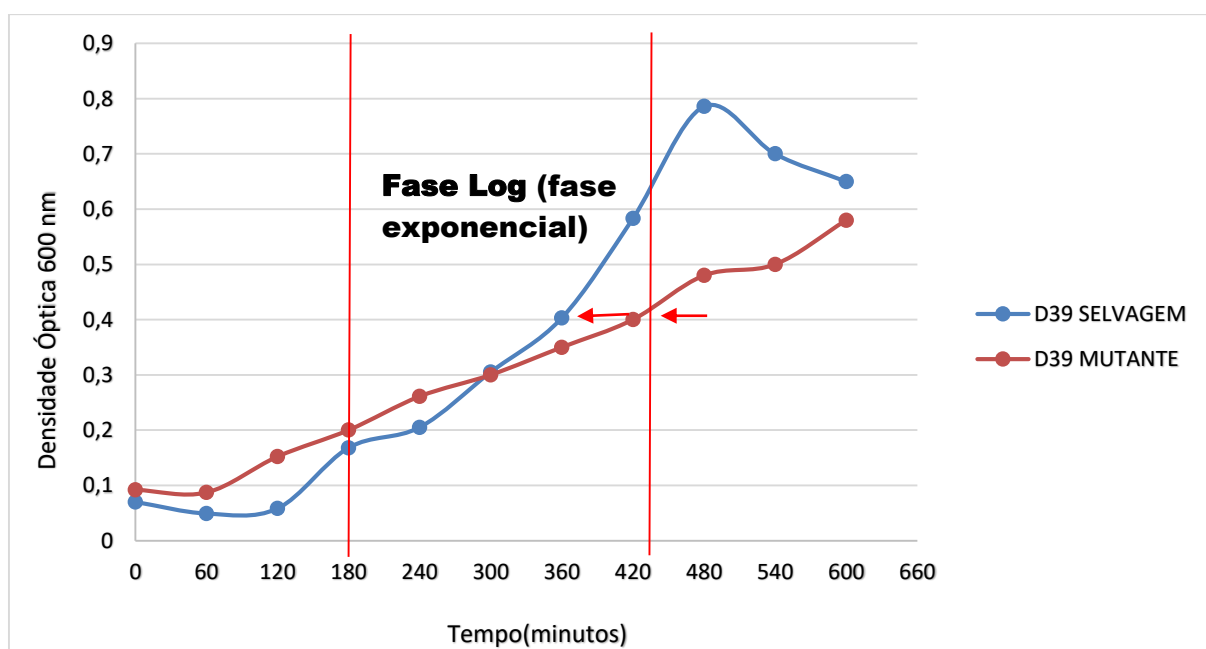


FIGURA 4. Curva de crescimento D39 selvagem e mutante para o gene de PspA. A curva mostra o crescimento dos cultivos bacterianos (selvagem/mutante) em relação ao tempo. As linhas verticais delimitam a fase exponencial de crescimento e as setas indicam a absorvância selecionada para realizar os experimentos.

Além das medidas de absorvância dos cultivos, foi realizado também o plaqueamento das bactérias na $D.O_{600nm}=0,4$. Esta foi a absorvância escolhida para o tratamento com a indolicidina, por representar populações bacterianas em fase exponencial de crescimento (CONVERSO et al.,2017). Foi quantificado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL, mostrado na figura 5. Observou-se um número aproximado de 10^6 células bacterianas por mL de cultivo, correspondendo a uma $D.O_{600nm}=0,4$. Esse foi, portanto, o número aproximado de bactérias por amostra, nos experimentos a seguir.

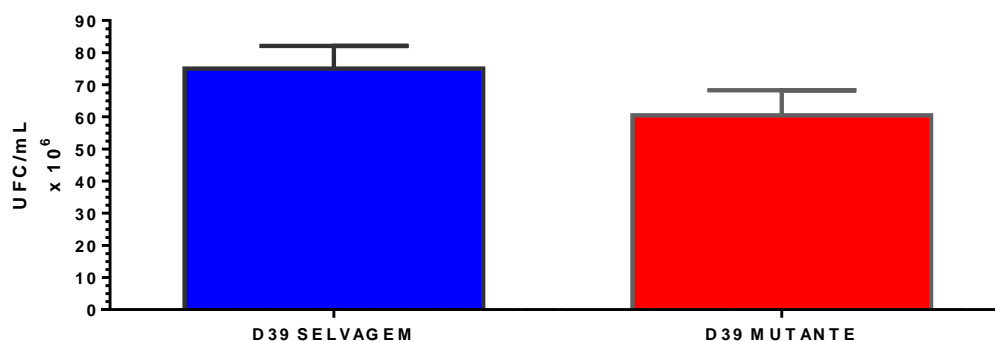


FIGURA 5. Avaliação do número de UFCs de *Streptococcus pneumoniae* selvagem e mutante na D.O._{600nm} = 0,4. Amostras dos cultivos foram diluídas serialmente e plaqueadas em ágar sangue. O número de unidades formadoras de colônias foi determinado pela contagem na menor diluição onde se observavam colônias individualizadas.

4.2 Determinação da concentração de indolicidina para utilização dos testes comparativos sobre *S. pneumoniae* in vitro

Com o objetivo de definir quais seriam as concentrações de indolicidina capazes de promover a redução na viabilidade de pneumococos selvagens D39, o cultivo foi incubado na presença de concentrações crescentes de indolicidina (7,81 µg/mL; 15,62 µg/mL; 31,25 µg/mL; 62,5 µg/mL; 125 µg/mL) e o número de UFCs, comparado ao grupo controle não tratado. A Figura 6 mostra os resultados desta análise. De maneira geral, observa-se um efeito dose-dependente na ação da indolicidina sobre o pneumococo, sendo que todas as concentrações do antimicrobiano foram capazes de reduzir significativamente a sobrevivência da bactéria. Nas concentrações mais altas de indolicidina (125 µg/mL e 62,5 µg/mL), não houve contagem de UFCs, ou seja, a indolicidina nessas concentrações foi capaz de inibir totalmente o crescimento da estirpe de D39 selvagem. O tratamento com indolicidina na concentração de 31,25 µg/mL causou uma redução de cerca de meio Log₁₀ quando comparado com o grupo controle, um resultado semelhante ao observado no grupo tratado com 15,62 µg/mL do peptídeo. O grupo que recebeu a menor concentração de indolicidina (7,81 µg/mL) também apresentou redução significativa na contagem de pneumococos sobreviventes.

A avaliação dos efeitos da indolicidina sobre pneumococos já foi realizada por outros grupos. Na pesquisa realizada por (JINDAL et al., 2015), observou-se a atividade antimicrobiana de novos peptídeos sintéticos derivados da indolicidina comercial contra isolados clínicos de *S. pneumoniae*, neste mesmo estudo, também foram testadas diferentes concentrações da indolicidina sobre vários isolados clínicos de *S. pneumoniae*. Como resultado,

determinou-se a concentração inibitória mínima de indolicidina entre 15,62-31,25 $\mu\text{g/mL}$, semelhante ao observado no presente estudo.

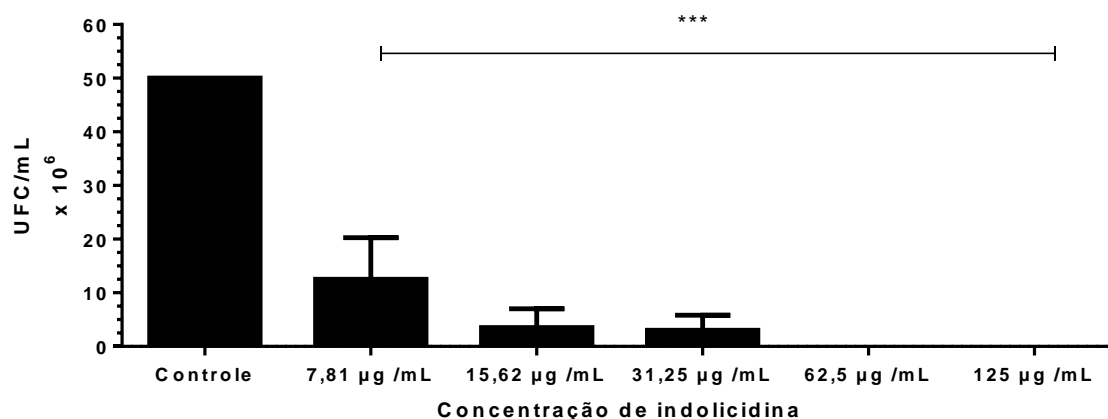


FIGURA 6. Determinação da concentração da indolicidina capaz de reduzir a viabilidade de *Streptococcus pneumoniae* selvagem. A estirpe D39 selvagem foi incubada na presença de concentrações crescentes de indolicidina (7,81 $\mu\text{g/mL}$; 15,62 $\mu\text{g/mL}$; 31,25 $\mu\text{g/mL}$; 62,5 $\mu\text{g/mL}$; 125 $\mu\text{g/mL}$). O grupo controle não recebeu tratamento com a indolicidina foi incubado somente com solução de ensaio. Esses grupos foram plaqueados em ágar sangue e incubados (overnight) a 37 °C. As colunas representam o número de UFC/mL recuperadas em cada grupo após o tratamento. *** $p < 0,001$, em comparação ao controle não tratado.

4.3 Comparação da ação de indolicidina entre *S. pneumoniae* selvagem e mutante para o gene *pspA*

A etapa seguinte do estudo envolveu a comparação dos efeitos da indolicidina em pneumococos selvagem e mutante negativo para PspA. Para esta análise, as concentrações de indolicidina utilizadas foram de 3,90 $\mu\text{g/mL}$, 7,81 $\mu\text{g/mL}$, 15,62 $\mu\text{g/mL}$ e 31,25 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que valores maiores que essas concentrações causam inibição total do pneumococo, impossibilitando a comparação do efeito da indolicidina entre as cepas selvagem e mutante. As Figuras 7 mostram os resultados desta análise. Novamente, a indolicidina foi capaz de reduzir a viabilidade bacteriana em todas as doses testadas, tanto na cepa selvagem, quanto na mutante. Pode-se observar ainda que este efeito foi mais marcante na cepa mutante: as doses mais altas de indolicidina (31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 15,62 $\mu\text{g/mL}$) aboliram completamente o crescimento da bactéria PspA-negativa, enquanto a cepa selvagem D39 apresentou crescimento – embora reduzido – nas duas concentrações citadas do peptídeo. Comparando-se a sobrevivência das bactérias selvagem e mutante na mesma dose de indolicidina, observa-se que o grupo mutante foi significativamente mais sensível à ação da indolicidina nas concentrações de 7,81 $\mu\text{g/mL}$, 15,62 $\mu\text{g/mL}$ e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7).

Comparação da ação de indolicidina entre *Streptococcus pneumoniae* selvagem e mutante para o gene *PspA*

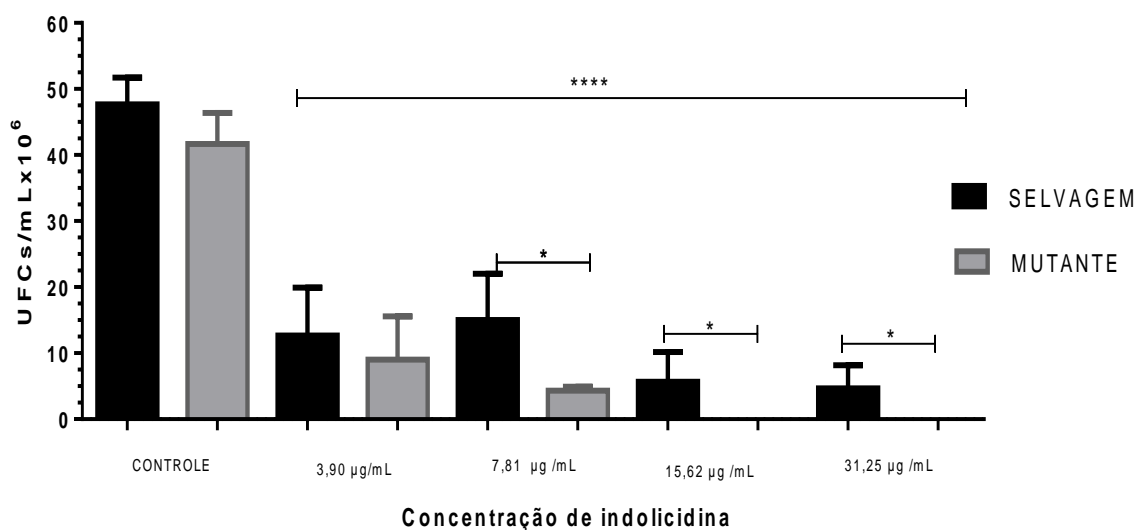


FIGURA 7: Comparação da ação de indolicidina entre *S. pneumoniae* selvagem e mutante para o gene *pspA*.

As estirpes D39 selvagem e mutante foram incubadas na presença de concentrações crescentes de indolicidina (3,9 µg/mL; 7,81 µg/mL; 15,62 µg/mL; 31,25 µg/mL). O grupo controle foi incubado somente com solução de ensaio. Esses grupos foram plaqueados em ágar sangue e incubados (overnight) a 37 °C. As colunas representam o número de UFCs recuperadas em cada grupo após o tratamento. Para cada grupo (selvagem/mutante) todas as concentrações de indolicidina causaram uma redução significativa em relação ao seu respectivo controle não tratado, onde ****= $p < 0,0001$. Comparando-se mutante e selvagem tratados com a mesma concentração de indolicidina, *= $p < 0,05$.

Em conjunto, os resultados sugerem que a expressão da proteína PspA afeta positivamente a sobrevivência do pneumococo ao tratamento com indolicidina, uma vez que a cepa mutante, que não apresenta PspA em sua superfície, mostrou-se mais susceptível à ação do peptídeo.

Um Estudo realizado por (JINDAL et al.,2015) utilizou ferramentas de modelagem molecular para investigar o modo de ligação de três fatores de virulência do *S. pneumoniae*: autolisina (LytA), pneumolisina (Ply) e proteína de superfície A (PspA) à indolicidina. Os resultados observados indicaram que a indolicidina comercial e seus análogos apresentam forte afinidade de ligação com a PspA. Nossos resultados confirmam as observações daquele grupo, demonstrando que a presença da PspA na superfície do *S. pneumoniae* reduz a ação da indolicidina sobre a bactéria. Observa-se que a cepa selvagem sofre uma redução na viabilidade após o tratamento com indolicidina, no entanto, este efeito foi mais evidente na cepa mutante, indicando que a ausência de PspA torna a bactéria mais sensível à ação da indolicidina. A cepa

mutante foi significativamente mais sensível ao AMP nas concentrações de 7,81, 15,62 e 31,25 µg/mL.

Assim foi verificado que a presença de PspA protege parcialmente a bactéria da ação lítica da indolicidina, visto que a bactéria selvagem apresenta uma redução na viabilidade apenas nas concentrações mais altas do peptídeo, enquanto a cepa mutante que não expressa PspA apresentou inibição total do crescimento nas concentrações de 15,62 e de 31,25 µg/mL. Uma possível explicação para este resultado é que a proteína PspA, ao interagir com a indolicidina (conforme demonstrado por JINDAL et al, 2015) impede sua ligação à membrana celular da bactéria, onde teria seu efeito lítico. Assim, a presença de PspA promoveria uma redução nos efeitos líticos da indolicidina, por sequestrá-la, limitando sua ligação ao sítio alvo.

A proteína PspA já foi identificada como alvo de ligação da lactoferrina, uma outra proteína com ação antimicrobiana presente no leite e em secreções mucosas (HAKANSSON et al., 2001; HAMMERSCHMIDT et al., 1999). A lactoferrina apresenta ação bacteriostática – pelo sequestro de ferro, impedindo a utilização deste íon metálico pelas bactérias na mucosa – e bactericida. A ação bactericida da lactoferrina envolve sua proteólise, com a liberação de peptídeos catiônicos (lactoferricinas) que se inserem na membrana celular bacteriana e causam sua desestabilização (JENSSEN; HANCOCK, 2009). A ligação da lactoferrina com a PspA estabiliza a apolactoferrina, impedindo sua proteólise e a consequente liberação de lactoferricinas que causam a lise do pneumococo. Dessa forma, a presença de PspA correlaciona-se a um menor efeito lítico da lactoferrina sobre a bactéria (HAKANSSON et al., 2001). Estudos posteriores confirmaram a ligação específica de PspA e lactoferrina e demonstraram que a adição de anticorpos anti-PspA poderia potencializar o efeito lítico deste AMP sobre a bactéria (ANDRE et al., 2015; SHAPER et al., 2004).

Com base nos resultados obtidos, é possível inferir que a PspA age sobre a indolicidina de forma semelhante ao observado para a lactoferrina: através da interação com o AMP, a proteína reduz sua atividade lítica por impedir o acesso do peptídeo ao seu alvo de ação, a membrana plasmática. É importante salientar, no entanto, que mais estudos são necessários para averiguar se a PspA na superfície bacteriana interage especificamente com a indolicidina para promover a inibição de sua ação lítica.

4.4 Efeito da adição de PspA recombinante sobre a ação lítica de indolicidina

Foi analisada a ação protetora de PspA no efeito bactericida da indolicidina sobre pneumococo selvagem, pela adição de fragmentos recombinantes de PspA aos grupos tratados

com indolicidina. Este ensaio teve como objetivo averiguar se moléculas livres de PspA adicionadas à reação seriam capazes de interagir com a indolicidina e afetar sua ligação ao pneumococo.

Foram utilizados dois fragmentos contendo a região N-terminal completa de PspAs de família 1, as proteínas PspA 278 e PspA P399, avaliadas separadamente. Estas moléculas (produzidas de forma recombinante em *E. coli* e purificadas) foram selecionadas por serem candidatos vacinais previamente investigados em ensaios pré-clínicos, que apresentaram elevada reatividade cruzada entre bactérias que expressam PspAs da família 1 (CONVERSO et al., 2017; GOULART et al., 2011).

A avaliação de duas moléculas de PspA levemente diferentes teve como objetivo investigar se pequenas variações na estrutura da PspA afetariam a sua ligação à indolicidina. Já a utilização de fragmentos proteicos contendo apenas a região N-terminal da molécula de PspA se justifica pelo fato de que as vacinas baseadas em PspA em desenvolvimento contém principalmente esta região da molécula, por se tratar da porção mais imunogênica e que inclui os domínios funcionais de PspA (GOULART et al., 2011). Além disso, um estudo de Shaper et al (2004) identificou uma região no final da porção N-terminal de PspA, que é responsável pela ligação à lactoferrina e consequente inibição de seu efeito lítico. Essa sequência de 11 aminoácidos, denominada SM-1, está presente nas duas PspAs utilizadas neste estudo.

Analisando a Figura 8, é possível verificar que, conforme esperado, a adição das proteínas recombinantes purificadas (PspA 278 e PspA P399) inibiram o efeito bactericida da indolicidina sobre o pneumococo. Os grupos tratados com indolicidina mais uma das PspAs recombinantes apresentaram sobrevivência significativamente superior ao tratado com indolicidina e BSA (placebo). Este resultado indica que o efeito das PspAs recombinantes é específico, e não apenas o resultado da adição de uma proteína exógena à reação. Interessante notar que as duas PspAs recombinantes, PspA 278 e PspA 339, apresentaram o mesmo efeito, sem diferenças entre elas. Esse dado sugere que a pequena variação nas sequências das duas moléculas não afetou sua capacidade de interagir com a indolicidina.

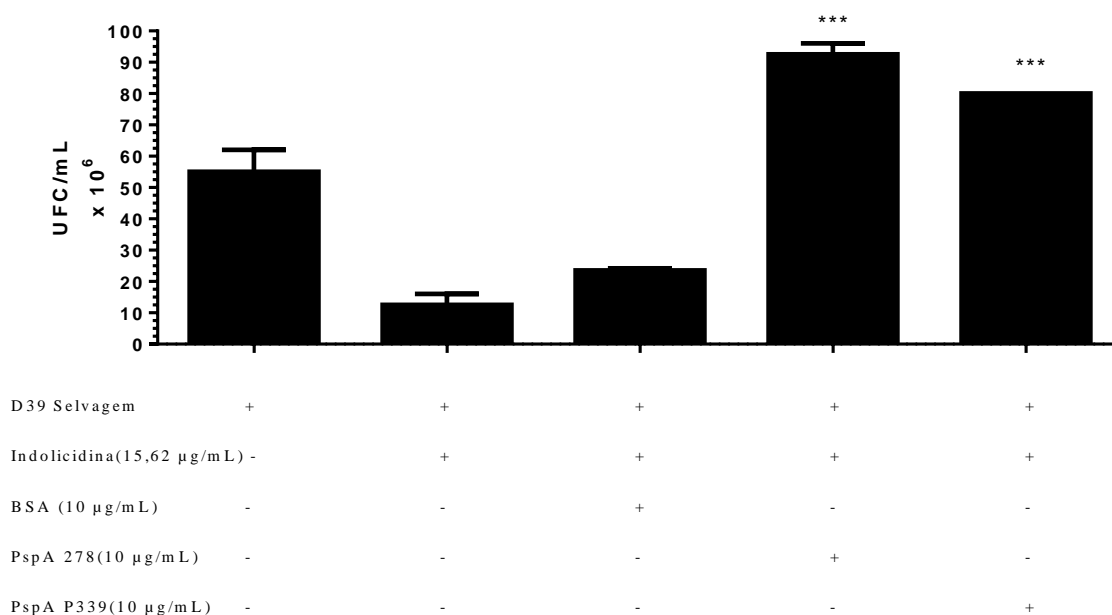


FIGURA 8. Efeito da adição de PspA recombinante sobre a ação lítica de indolicidina. A estirpe D39 selvagem foi submetida a 5 condições: 1ª D39 selvagem somente com AS; 2ª D39 selvagem+ indolicidina 15,62 µg/mL; 3ª D39 selvagem+ indolicidina 15,62 µg/mL+ BSA 10 µg/mL; 4ª D39 selvagem+ indolicidina 15,62 µg/mL+ PspA 278 10 µg/mL ; D39 selvagem+ indolicidina 15,62 µg/mL+ PspA P339 10 µg/mL. As colunas correspondem ao número de UFC/mL recuperadas em cada grupo após o tratamento. ***p<0,001, em comparação ao controle (tratado com indolicidina + BSA).

A redução no efeito lítico da indolicidina na presença de PspAs recombinantes – atestada pelo maior número de bactérias viáveis nos grupos tratados com indolicidina e PspA recombinante, em relação com tratado com indolicidina e BSA – pode ser resultante da competição da PspA livre (proteína recombinante adicionada à reação) pela ligação à indolicidina, resultando em menos peptídeo disponível para inserção na membrana celular da bactéria. De fato, um resultado semelhante foi obtido em dois estudos independentes avaliando o efeito de PspA na ação da lactoferrina sobre o pneumococo (ANDRE et al., 2015; SHAPER et al., 2004). Além de reforçar o papel de PspA na interação com a indolicidina, este dado indica que mesmo a PspA solúvel (não aderida à superfície bacteriana) é capaz de reconhecer e se ligar ao AMP.

A ligação entre a PspA e a lactoferrina foi observada quando esse peptídeo está na forma livre de ferro – Apolactoferrina, forma lítica – demonstrando que a interação de fato interfere com a atividade bactericida da lactoferrina (HAKANSSON et al.,2001; SHAPER et al., 2004;

SHAPER et al., 2011). Em conformidade com estes dados, um estudo de (SENKOVICH et al., 2007) avaliando a estrutura cristalizada de um complexo formado pelo domínio de ligação à lactoferrina de PspA ligado ao lobo N da lactoferrina, demonstrou que as hélices negativas de PspA interagem de forma específica com a região altamente carregada positivamente da lactoferrina, a lactoferricina. Foi verificado ainda que esta ligação bloqueia o acesso à lactoferricina na molécula da lactoferrina, impedindo sua interação com a membrana bacteriana e, conseqüentemente, limitando a lise da bactéria. Foi observado ainda que a interação entre PspA e lactoferrina envolve interações eletrostáticas específicas e fortes. Os dados do presente estudo sugerem que um mecanismo de interação semelhante pode ocorrer entre PspA e indolicidina.

4.5 Efeito dos anticorpos anti-PspA sobre a ação lítica de indolicidina

Após a verificação de que a adição de PspAs recombinantes era capaz de inibir a ação lítica da indolicidina sobre o pneumococo, foi avaliado o potencial dos anticorpos anti-PspA em favorecer a ação lítica da indolicidina sobre a bactéria. A hipótese levantada foi de que os anticorpos, ao se ligarem à PspA expressa na superfície da bactéria, bloqueariam sua interação com a indolicidina, deixando o peptídeo livre para se inserir na membrana bacteriana e causar lise.

Como fonte de anticorpos anti-PspA, foram utilizados soros de camundongos imunizados com fragmentos recombinantes de PspAs de família 1, PspA245 (clado 1) e PspA 94 (clado 2). Estes soros foram selecionados por serem capazes de reconhecer um grande número de isolados de pneumococo que possuem PspAs de família 1 (Goulart et al., 2011). Uma vez que diferentes PspAs apresentam graus de reconhecimento cruzado variáveis, optou-se por utilizar um soro contra PspA de clado 2 (PspA94, homólogo à PspA expressa pela bactéria do estudo) e outro contra PspA 245 (clado 1, heterólogo, mas ainda pertencente à mesma família).

Para este ensaio, o isolado D39 selvagem (que expressa PspA de clado 2) foi primeiramente incubado na presença de soro de camundongos contendo anticorpos anti PspA 245 (clado1) ou anti PspA 94 (clado 2) nas concentrações finais de 1 e 5%. O grupo controle foi incubado com soro de animais injetados apenas com adjuvante (soro salina) nas mesmas concentrações, 1 e 5%. Em seguida, as amostras foram acrescidas de indolicidina nas concentrações de 15,62 e 31,25 µg/mL e as bactérias sobreviventes, plaqueadas e contadas.

A Figura 9 mostra o resultado referente a adição dos soros com indolicidina a 15,62 µg/mL. Observa-se que a indolicidina nessa concentração não reduziu de forma significativa o número de unidade formadoras de colônias tanto no soro anti PspA 94 quanto no soro anti PspA 245

em nenhuma das concentrações avaliadas; em todas as condições, o resultado foi semelhante ao controle (bactéria tratada com indolicidina mais soro salina).

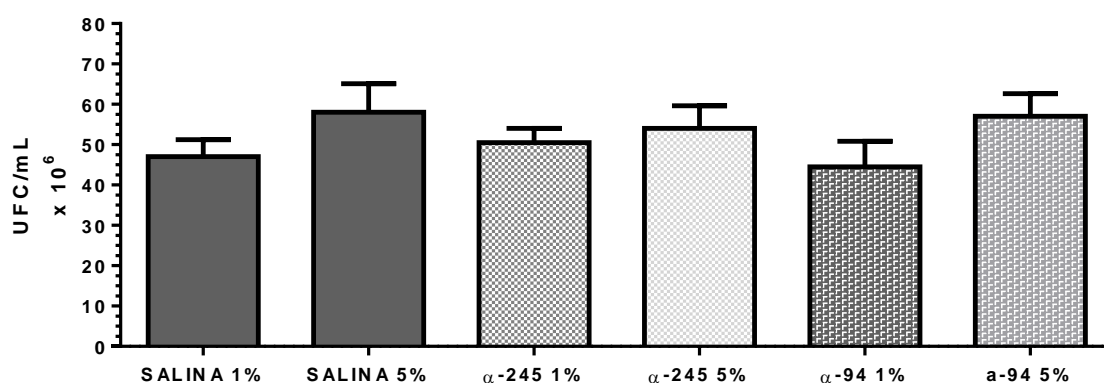


FIGURA 9. Efeito dos anticorpos anti-PspA sobre a ação lítica de indolicidina na concentração de 15,62 µg/mL. A estirpe D39 selvagem foi submetida a 6 condições: 1ª D39 selvagem + soro salina 1%+ indolicidina 15,62 µg/mL; 2ª D39 selvagem+soro salina 5%+ indolicidina 15,62 µg/mL; 3ª D39 selvagem+ indolicidina 15,62 µg/mL+ soro anti PspA 245 1%; 4ª D39 selvagem+ indolicidina 15,62 µg/mL+ soro anti PspA 245 5%; D39 selvagem+ indolicidina 15,62 µg/mL+ soro anti PspA 94 1%; 6ª D39 selvagem+ indolicidina 15,62 µg/mL+ soro anti PspA 94 5%. As colunas correspondem ao número de UFC/mL recuperadas em cada grupo após o tratamento. O grupo controle recebeu o tratamento com salina 1% e 5% (um soro controle que não apresenta anticorpos).

Uma vez que não foi observada diferença na ação da indolicidina na concentração de 15,62 µg/mL com os soros adicionados (Figura 9), foi avaliada uma concentração maior de indolicidina (31,25 µg/mL) com os soros anti-PspA 94 e 245 (1% e 5%). A figura 10 A e B mostra o resultado desta análise. Nesta concentração de indolicidina, é possível observar um efeito dos anticorpos anti-PspA favorecendo a lise da bactéria, quando se utilizou 5% de soro. Este efeito foi mais marcante quando foi adicionado soro anti-PspA 94 – produzido contra uma PspA de mesmo clado daquela expressa na bactéria. Nas amostras contendo 1% de soro, embora seja possível observar uma tendência a uma redução no número de bactérias sobreviventes, a diferença não foi significativa. Esse resultado mostra a importância da PspA para proteção da bactéria, pois ao adicionar o soro anti-PspA ocorre um bloqueio da proteína de superfície do pneumococo, e facilitando a ação da indolicidina na eliminação do patógeno. Também se observa que o efeito mais acentuado foi obtido quando se utilizou anticorpos contra uma PspA homóloga (do mesmo clado) àquela expressa na superfície bacteriana. Este dado reforça a

necessidade de se investigar diversas PspAs de clados e famílias distintos, a fim de determinar as moléculas com maior potencial protetor.

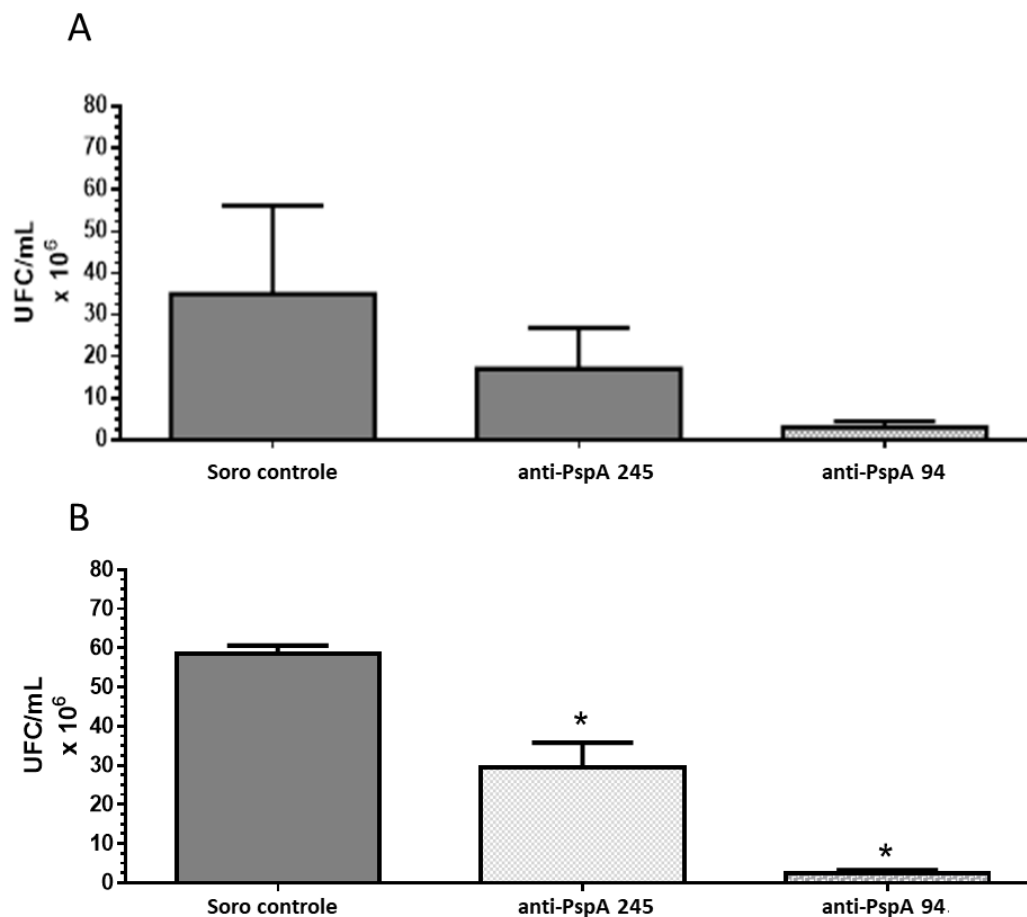


FIGURA 10 Efeito dos anticorpos anti-PspA 1% (A) E 5% (B) sobre a ação lítica de indolicidina na concentração de 31,25 µg/mL. A estirpe D39 selvagem foi submetida ao tratamento com indolicidina na concentração de 31,25 µg/mL mais adição de soro contendo anticorpos anti-PspA 245 e anti-PspA 94 nas concentrações de 1% (A) e 5% (B). As colunas correspondem ao número de UFC/mL recuperadas em cada grupo após o tratamento. O grupo controle recebeu o tratamento com soro salina nas mesmas concentrações dos soros específicos.* p<0,05 em comparação ao grupo controle.

A capacidade dos anticorpos anti-PspA em aumentar o efeito bactericida de um peptídeo antimicrobiano já foi observada em estudos avaliando a ação da lactoferrina sobre o pneumococo (SHAPER et al., 2004; ANDRE et al., 2015). O estudo realizado por (ANDRE, 2015) testou a capacidade de anticorpos anti-PspA em aumentar a morte mediada por lactoferrina em quatro cepas de pneumococos (A66, 245,679,3JY2370) de diferentes sorotipos que expressam PspA dos clados 1 a 4. Naquele estudo, após a incubação da bactéria com uma concentração definida de lactoferrina juntamente com adição de soro anti-PspA, houve um

aumento na morte da bactéria em todas as cepas de pneumococo utilizadas. Essa redução foi observada nas estirpes que o soro anti-PspA tinha o mesmo clado e também em estirpe que expressam clados e família diferentes, ou seja, os anticorpos anti-PspA apresentaram capacidade em reconhecer moléculas de clados de famílias diferentes. Então, observou-se que mesmo a PspA apresentando variabilidade, diferentes soros anti-PspA são capazes de reagir de forma cruzada entre si, podendo assim impossibilitar a proteção de PspA para a bactéria e facilitar a ação de peptídeos antimicrobianos como a lactoferrina. Os dados do presente trabalho mostram que o mesmo se aplica à indolicidina; os anticorpos favoreceram a ação lítica do AMP, sendo o efeito maior quando se utilizou um soro de PspA homóloga à da bactéria.

Os anticorpos ligados a PspA desencadeiam dois mecanismos que facilitam a ação da lactoferrina sobre o pneumococo: 1- Impede que a proteína de superfície A da bactéria se ligue a apolactoferrina; 2- Permite que ocorra a proteólise da lactoferrina, liberando lactoferrina que desestabiliza a membrana do pneumococo. A constatação de que anticorpos anti-PspA são capazes de favorecer a ação de peptídeos antimicrobianos reforça o potencial vacinal desta molécula, sugerindo um possível mecanismo que pode ser ativado pela vacinação, para promover uma rápida eliminação do patógeno. No caso da lactoferrina – uma proteína prevalente nas mucosas – a ação dos anticorpos poderia reduzir a colonização da nasofaringe pela bactéria. Já a indolicidina é produzida e armazenada nos neutrófilos – um fagócito com papel fundamental na eliminação de pneumococos em diferentes sítios(ANDRE et al., 2015).

A PspA é um importante fator de virulência em pneumococos (DARRIEUX et al., 2015). Em um experimento animal observou-se que cepas de pneumococo negativas de PspA foram eliminadas mais rapidamente do que cepas que apresentavam PspA em sua superfície (TU et al., 1999). Observou-se que PspA induz a resposta imune protetora contra infecção causada pela bactéria. Foi observado o efeito de PspA na virulência bacteriana e na ativação do sistema complemento, os resultados sugerem que PspA atua na inibição da deposição de C3b na superfície bacteriana, resultando na inibição da opsonofagocitose da bactéria, pela via alternativa (REN et al., 2012; GOULART et al., 2011; MORENO et al., 2010;).

Pesquisas posteriores também demonstraram que a proteína de superfície A do pneumococo dificulta a atividade do sistema complemento impedindo a fagocitose e como consequência a eliminação da bactéria. Foi observado também que a presença de anticorpos anti-PspA é capaz de amplificar a deposição de C3b na superfície da bactéria, levando a uma fagocitose mais eficiente no hospedeiro (REN et al., 2012; GOULART et al., 2011; MORENO et al., 2010;).

Um ensaio de colonização experimental em humanos observou uma forte relação entre a presença de anticorpos anti-PspA e a proteção contra colonização por pneumococo em voluntários (McCOOL et al., 2002). De forma semelhante, estudos pré-clínicos utilizando camundongos demonstram que a imunização com PspA combinada com outras proteínas de pneumococo protege contra a colonização (BRILLES et al., 2000; FERREIRA et al., 2010; CONVERSO et al., 2017)

A elevada imunogenicidade de PspA e seu potencial protetor em diversos modelos de infecção a tornam um candidato promissor a uma vacina proteica contra o pneumococo. Nesse sentido, uma maior compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos na proteção mediada por PspA consiste em uma etapa primordial no desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficazes.

A partir dos dados gerados neste estudo, que a proteína PspA afeta a ação do peptídeo catiônico indolicidina sobre o pneumococo, protegendo a bactéria do efeito lítico deste AMP. De forma importante, observa-se que anticorpos induzidos pela vacinação com PspA bloqueiam o efeito protetor desta molécula, facilitando a eliminação da bactéria pelo sistema imune.

5 CONCLUSÃO

- *S. pneumoniae* foi parcialmente resistente à ação bactericida da indolicidina;
- A cepa mutante que não expressa PspA foi mais sensível à ação da indolicidina, quando comparada à bactéria selvagem que possui PspA;
- A adição de PspAs recombinantes inibiu a ação bactericida da indolicidina, possivelmente por sequestrar o peptídeo, impedindo sua ligação à membrana celular do pneumococo;
- Variações na estrutura da PspA recombinante utilizada não afetaram sua ligação à indolicidina, uma vez que PspAs de clados diferentes promoveram efeito semelhante;
- A presença de anticorpos anti-PspA foi capaz de ampliar os efeitos líticos da indolicidina sobre *S. pneumoniae*, sendo o efeito mais acentuado quando se utilizou anticorpos derivados de molécula homóloga àquela expressa pela bactéria.

Os resultados obtidos nesse estudo abrem uma nova possibilidade de ação da proteína PspA, pela interação com indolicidina, limitando seu efeito bactericida sobre o pneumococo. Os dados sugerem que PspA desempenha uma ação mais ampla do que inicialmente descrito, agindo não apenas sobre a lactoferrina, como também a indolicidina, ambos peptídeos catiônicos com mecanismo de ação semelhante contra o pneumococo. Estes dados reforçam o potencial de PspA como candidato vacinal, ao induzir a produção de anticorpos capazes de ampliar os efeitos de peptídeos antimicrobianos como a indolicidina, facilitando assim a eliminação do patógeno e podendo reduzir o uso de antibióticos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA. Vacina pneumocócica conjugada 13- valente contra doenças pneumocócicas em pacientes de risco. **ANVISA**, Fevereiro, 2018. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2018/Relatorio_Vacina_PneumococicaConjugada-13valente_CP69_2018.pdf. Acesso: 18/07/2019.
- ANVISA. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. **ANVISA**, Maio, 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Plano+Nacional+para+a+Preven%C3%A7%C3%A3o+e+o+Controle+da+Resist%C3%A2ncia+Microbiana+nos+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde/9d9f63f3-592b-4fe1-8ff2-e035fcc0f31d>. Acesso: 18/07/2019.
- ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. **ANVISA**, Dezembro, 2017. Disponível em: www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude. Acesso: 18/07/2019
- AHMAD, I.; PERKINS, W. R.; LUPAN, D. M.; SELSTED, M. E.; JANOFF, A. S. Liposomal entrapment of the neutrophil-derived peptide indolicidin endows it with in vivo antifungal activity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1237, n. 2, p. 109-114, 1995.
- ANDRE, G. O.; POLITANO, W. R.; MIRZA, S.; CONVERSO, T. R.; FERRAZ, L. F.; LEITE, L. C.; DARRIEUX, M. Combined effects of lactoferrin and lysozyme on *Streptococcus pneumoniae* killing. **Microb Pathog**, v. 89, p. 7-17, 2015.
- BAHAR, A. A.; REN, D. Antimicrobial peptides. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, n. 12, p. 1543-1575, 2013.
- BEITER, K.; WARTHA, F.; HURWITZ, R.; NORMARK, S.; ZYCHLINSKY, A.; HENRIQUES-NORMARK, B. The capsule sensitizes *Streptococcus pneumoniae* to alpha-defensins human neutrophil proteins 1 to 3. **Infect Immun**, v. 76, n. 8, p. 3710-3716, 2008.
- BONTEN, M. J.; HUIJTS, S. M.; BOLKENBAAS, M.; WEBBER, C.; PATTERSON, S.; GAULT, S.; VAN WERKHOVEN, C. H.; VAN DEURSEN, A. M.; SANDERS, E. A.; VERHEIJ, T. J.; PATTON, M.; MCDONOUGH, A.; MORADOGHLI-HAFTVANI, A.; SMITH, H.; MELLELIEU, T.; PRIDE, M. W.; CROWTHER, G.; SCHMOELE-THOMA, B.; SCOTT, D. A.; JANSEN, K. U.; LOBATTO, R.; OOSTERMAN, B.; VISSER, N.; CASPERS, E.; SMORENBURG, A.; EMINI, E. A.; GRUBER, W. C.; GROBBEE, D. E. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. **N Engl J Med**, v. 372, n. 12, p. 1114-1125, 2015.

BRAIDO, F.; BELLOTTI, M.; DE MARIA, A.; CAZZOLA, M.; CANONICA, G. W. The role of Pneumococcal vaccine. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 21, n. 4, p. 608-615, 2008.

BRILES, D. E.; ADES, E.; PATON, J. C.; SAMPSON, J. S.; CARLONE, G. M.; HUEBNER, R. C.; VIROLAINEN, A.; SWIATLO, E.; HOLLINGSHEAD, S. K. 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**, v. 68, n. 2, p. 796-800, 2000.

CONVERSO, T. R.; GOULART, C.; DARRIEUX, M.; LEITE, L. C. C. A protein chimera including PspA in fusion with PotD is protective against invasive pneumococcal infection and reduces nasopharyngeal colonization in mice. **Vaccine**, v. 35, n. 38, p. 5140-5147, 2017

CONVERSO, T. R.; GOULART, C.; RODRIGUEZ, D.; DARRIEUX, M.; LEITE, L. C. C. Rational selection of broadly cross-reactive family 2 PspA molecules for inclusion in chimeric pneumococcal vaccines. **Microb Pathog**, v. 109, p. 233-238, 2017.

COSTA, F.; TEIXEIRA, C.; GOMES, P.; MARTINS, M. C. L. Clinical Application of AMPs. **Adv Exp Med Biol**, v. 1117, p. 281-298, 2019.

DARRIEUX, M.; GOULART, C.; BRILES, D.; LEITE, L. C. Current status and perspectives on protein-based pneumococcal vaccines. **Crit Rev Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 190-200, 2015.

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**, v. 75, n. 12, p. 5930-5938, 2007.

DARRIEUX, M.; MORENO, A. T.; FERREIRA, D. M.; PIMENTA, F. C.; DE ANDRADE, A. L.; LOPES, A. P.; LEITE, L. C.; MIYAJI, E. N. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 3, p. 273-278, 2008.

EBBENSGAARD, A.; MORDHORST, H.; OVERGAARD, M. T.; NIELSEN, C. G.; AARESTRUP, F. M.; HANSEN, E. B. Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Antimicrobial Peptides against a Range of Pathogenic Bacteria. **PLoS One**, v. 10, n. 12, p. e0144611, 2015.

FALLA, T. J.; KARUNARATNE, D. N.; HANCOCK, R. E. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. **J Biol Chem**, v. 271, n. 32, p. 19298-19303, 1996.

FERREIRA, D. M.; OLIVEIRA, M. L.; MORENO, A. T.; HO, P. L.; BRILES, D. E.; MIYAJI, E. N. Protection against nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). **Microb Pathog**, v. 48, n. 6, p. 205-213, 2010.

FRIEDRICH, C. L.; ROZEK, A.; PATRZYKAT, A.; HANCOCK, R. E. Structure and mechanism of action of an indolicidin peptide derivative with improved activity against gram-positive bacteria. **J Biol Chem**, v. 276, n. 26, p. 24015-24022, 2001.

GALDIERO, E.; SICILIANO, A.; MASELLI, V.; GESUELE, R.; GUIDA, M.; FULGIONE, D.; GALDIERO, S.; LOMBARDI, L.; FALANGA, A. An integrated study on antimicrobial activity and ecotoxicity of quantum dots and quantum dots coated with the antimicrobial peptide indolicidin. **Int J Nanomedicine**, v. 11, p. 4199-4211, 2016.

GHOSH, A.; KAR, R. K.; JANA, J.; SAHA, A.; JANA, B.; KRISHNAMOORTHY, J.; KUMAR, D.; GHOSH, S.; CHATTERJEE, S.; BHUNIA, A. Indolicidin targets duplex DNA: structural and mechanistic insight through a combination of spectroscopy and microscopy. **ChemMedChem**, v. 9, n. 9, p. 2052-2058, 2014.

GOULART, C.; DARRIEUX, M.; RODRIGUEZ, D.; PIMENTA, F. C.; BRANDILEONE, M. C.; DE ANDRADE, A. L.; LEITE, L. C. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**, v. 29, n. 8, p. 1634-1642, 2011.

HAKANSSON, A.; ROCHE, H.; MIRZA, S.; MCDANIEL, L. S.; BROOKS-WALTER, A.; BRILES, D. E. Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. **Infect Immun**, v. 69, n. 5, p. 3372-3381, 2001.

HAMMERSCHMIDT, S.; BETHE, G.; REMANE, P. H.; CHHATWAL, G. S. Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 67, n. 4, p. 1683-1687, 1999.

JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. Antimicrobial properties of lactoferrin. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 19-29, 2009.

JINDAL, H. M.; LE, C. F.; MOHD YUSOF, M. Y.; VELAYUTHAN, R. D.; LEE, V. S.; ZAIN, S. M.; ISA, D. M.; SEKARAN, S. D. Antimicrobial Activity of Novel Synthetic Peptides Derived from Indolicidin and Ranalexin against *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128532, 2015.

JINDAL, H. M.; ZANDI, K.; ONG, K. C.; VELAYUTHAN, R. D.; RASID, S. M.; SAMUDI RAJU, C.; SEKARAN, S. D. Mechanisms of action and in vivo antibacterial efficacy assessment of five novel hybrid peptides derived from Indolicidin and Ranalexin against *Streptococcus pneumoniae*. **PeerJ**, v. 5, p. e3887, 2017.

KHAN, F.; KHAN, M. A.; AHMED, N.; KHAN, M. I.; BASHIR, H.; TAHIR, S.; ZAFAR, A. U. Molecular Characterization of Pneumococcal Surface Protein A (PspA), Serotype Distribution and Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated from Pakistan. **Infect Dis Ther**, v. 7, n. 2, p. 277-289, 2018.

KHAN, F.; VIDAL, J. E.; KHAN, M. A.; AHMED, N.; KHAN, M. I.; BASHIR, H.; TAHIR, S.; ZAFAR, A. U. Correction to: Molecular Characterization of Pneumococcal Surface Protein A (PspA), Serotype Distribution and Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated from Pakistan. **Infect Dis Ther**, v. 7, n. 2, p. 291, 2018.

KUPPUSAMY, R.; WILLCOX, M.; BLACK, D. S.; KUMAR, N. Short Cationic Peptidomimetic Antimicrobials. **Antibiotics (Basel)**, v. 8, n. 2, 2019.

KONG, I. G.; SATO, A.; YUKI, Y.; NOCHI, T.; TAKAHASHI, H.; SAWADA, S.; MEJIMA, M.; KUROKAWA, S.; OKADA, K.; SATO, S.; BRILES, D. E.; KUNISAWA, J.; INOUE, Y.; YAMAMOTO, M.; AKIYOSHI, K.; KIYONO, H. Nanogel-based PspA intranasal vaccine

prevents invasive disease and nasal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 81, n. 5, p. 1625-1634, 2013.

KOTHARI, N.; KOTHARI, S.; CHOI, Y. J.; DEY, A.; BRILES, D. E.; RHEE, D. K.; CARBIS, R. A bivalent conjugate vaccine containing PspA families 1 and 2 has the potential to protect against a wide range of *Streptococcus pneumoniae* strains and *Salmonella Typhi*. **Vaccine**, v. 33, n. 6, p. 783-788, 2015.

MAHLAPUU, M.; HAKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJORN, C. Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 6, p. 194, 2016.

MANGONI, M. L.; MCDERMOTT, A. M.; ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. **Exp Dermatol**, v. 25, n. 3, p. 167-173, 2016.

MARRIOTT, H. M.; DOCKRELL, D. H. *Streptococcus pneumoniae*: the role of apoptosis in host defense and pathogenesis. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38, n. 11, p. 1848-1854, 2006.

MARTIN, L.; VAN MEEGERN, A.; DOEMMING, S.; SCHUERHOLZ, T. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. **Front Immunol**, v. 6, p. 404, 2015.

MIRZA, S.; WILSON, L.; BENJAMIN, W. H., JR.; NOVAK, J.; BARNES, S.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. Serine protease PrtA from *Streptococcus pneumoniae* plays a role in the killing of *S. pneumoniae* by apolactoferrin. **Infect Immun**, v. 79, n. 6, p. 2440-2450, 2011.

MORENO, A. T.; OLIVEIRA, M. L.; FERREIRA, D. M.; HO, P. L.; DARRIEUX, M.; LEITE, L. C.; FERREIRA, J. M., JR.; PIMENTA, F. C.; ANDRADE, A. L.; MIYAJI, E. N. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 3, p. 439-446, 2010.

NAN, Y. H.; PARK, K. H.; PARK, Y.; JEON, Y. J.; KIM, Y.; PARK, I. S.; HAHM, K. S.; SHIN, S. Y. Investigating the effects of positive charge and hydrophobicity on the cell selectivity, mechanism of action and anti-inflammatory activity of a Trp-rich antimicrobial peptide indolicidin. **FEMS Microbiol Lett**, v. 292, n. 1, p. 134-140, 2009.

OMARDIEN, S.; BRUL, S.; ZAAT, S. A. Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. **Front Cell Dev Biol**, v. 4, p. 111, 2016.

PARK, C. H.; VALORE, E. V.; WARING, A. J.; GANZ, T. Hepsidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. **J Biol Chem**, v. 276, n. 11, p. 7806-7810, 2001.

PARKER, D.; PRINCE, A. Innate immunity in the respiratory epithelium. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 45, n. 2, p. 189-201, 2011.

REDDY, K. V.; YEDERY, R. D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **Int J Antimicrob Agents**, v. 24, n. 6, p. 536-547, 2004.

REN, B.; LI, J.; GENSCHEMER, K.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. The absence of PspA or presence of antibody to PspA facilitates the complement-dependent phagocytosis of pneumococci in vitro. **Clin Vaccine Immunol**, v. 19, n. 10, p. 1574-1582, 2012.

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**, v. 72, n. 1, p. 114-122, 2004.

ROKITSKAYA, T. I.; KOLODKIN, N. I.; KOTOVA, E. A.; ANTONENKO, Y. N. Indolicidin action on membrane permeability: carrier mechanism versus pore formation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, n. 1, p. 91-97, 2011.

ROZEK, A.; FRIEDRICH, C. L.; HANCOCK, R. E. Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. **Biochemistry**, v. 39, n. 51, p. 15765-15774, 2000.

SCHACHERN, P. A.; TSUPRUN, V.; FERRIERI, P.; BRILES, D. E.; GOETZ, S.; CUREOGLU, S.; PAPARELLA, M. M.; JUHN, S. Pneumococcal PspA and PspC proteins: potential vaccine candidates for experimental otitis media. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol**, v. 78, n. 9, p. 1517-1521, 2014.

SCHLUESENER, H. J.; RADERMACHER, S.; MELMS, A.; JUNG, S. Leukocytic antimicrobial peptides kill autoimmune T cells. **J Neuroimmunol**, v. 47, n. 2, p. 199-202, 1993.

SENKOVICH, O.; COOK, W. J.; MIRZA, S.; HOLLINGSHEAD, S. K.; PROTASEVICH, II; BRILES, D. E.; CHATTOPADHYAY, D. Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein a provides insight into microbial defense mechanism. **J Mol Biol**, v. 370, n. 4, p. 701-713, 2007.

SHANG, D.; ZHANG, Q.; DONG, W.; LIANG, H.; BI, X. The effects of LPS on the activity of Trp-containing antimicrobial peptides against Gram-negative bacteria and endotoxin neutralization. **Acta Biomater**, v. 33, p. 153-165, 2016.

SHAPER, M.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BENJAMIN, W. H., JR.; BRILES, D. E. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]. **Infect Immun**, v. 72, n. 9, p. 5031-5040, 2004.

SUBBALAKSHMI, C.; KRISHNAKUMARI, V.; NAGARAJ, R.; SITARAM, N. Requirements for antibacterial and hemolytic activities in the bovine neutrophil derived 13-residue peptide indolicidin. **FEBS Lett**, v. 395, n. 1, p. 48-52, 1996.

TU, A. H.; FULGHAM, R. L.; MCCRORY, M. A.; BRILES, D. E.; SZALAI, A. J. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, v. 67, n. 9, p. 4720-4724, 1999.

VEGH, A. G.; NAGY, K.; BALINT, Z.; KERENYI, A.; RAKHELY, G.; VARO, G.; SZEGLETES, Z. Effect of antimicrobial peptide-amide: indolicidin on biological membranes. **J Biomed Biotechnol**, v. 2011, p. 670589, 2011.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P T**, v. 40, n. 4, p. 277-283, 2015a.

_____. The antibiotic resistance crisis: part 2: management strategies and new agents. **P T**, v. 40, n. 5, p. 344-352, 2015b.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. D1, p. D1087-1093, 2016.

WEN, Z.; LIU, Y.; QU, F.; ZHANG, J. R. Allelic Variation of the Capsule Promoter Diversifies Encapsulation and Virulence In *Streptococcus pneumoniae*. **Sci Rep**, v. 6, p. 30176, 2016.

WIESNER, J.; VILCINSKAS, A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. **Virulence**, v. 1, n. 5, p. 440-464, 2010.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, n. 6870, p. 389-395, 2002.

ZHANG, L. J.; GALLO, R. L. Antimicrobial peptides. **Curr Biol**, v. 26, n. 1, p. R14-19, 2016.