

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

KELVIN FELIPE GATINONI

**PAPEL DA PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO A
(PspA) NA AÇÃO DA DEFENSINA HNP-1 SOBRE *Streptococcus
pneumoniae***

Bragança Paulista

2022

KELVIN FELIPE GATINONI – R.A 001202015081

**PAPEL DA PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO A
(PspA) NA AÇÃO DA DEFENSINA HNP-1 SOBRE *Streptococcus
pneumoniae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Biologia Molecular e Celular.

Orientador: Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini.

Bragança Paulista

2022

WC 217 Gatinoni, Kelvin Felipe
G234p Papel da proteína de superfície de Pneumococo A (PspA) na
ação da defensina HNP-1 sobre *Streptococcus pneumoniae* /
Kelvin Felipe Gatinoni. -- Bragança Paulista, 2022.
53 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. Capsula polissacarídica.
3. Sorotipo. 4. Peptídeos antimicrobianos catiônicos.
5. Defensinas. I. Bertoncini, Michelle Darrieux Sampaio.
II. Título.

GATINONI, Kelvin Felipe. “**Papel da proteína de superfície de pneumococo A (PspA) na ação da defensina HNP-1 sobre *Streptococcus pneumoniae***”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 27 de junho de 2022 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

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

Profa. Dra. Tanila Wood dos Santos
Membro Externo

Prof. Dr. Thiago Rojas Converso
Universidade São Francisco

AGRADECIMENTOS

A Deus sempre, pela oportunidade de existir e guiar meus passos me conduzindo até aqui.

A minha mãe, Elizabete, mulher guerreira e de fibra que me deu valores e princípios.

A minha companheira, Rafaela, por estar presente em todos os momentos, principalmente nos difíceis.

A minha colega de laboratório, Bruna, fundamental para a conclusão deste trabalho, se apresentando prestativa em todas as situações.

A todos os professores do Programa Stricto Sensu em Ciências da Saúde, em especial minha orientadora Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini, conhecê-los foi primordial para a minha formação.

A Universidade São Francisco por viabilizar este sonho através do apoio financeiro na forma de bolsa BdC.

RESUMO

Introdução: *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é uma bactéria de grande importância clínica, responsável por cerca de um milhão de mortes anuais no mundo todo. O patógeno infecta o hospedeiro pelas vias aéreas superiores, onde se estabelece como colonizador assintomático da nasofaringe. Sob certas condições, a bactéria ganha acesso a outros tecidos do hospedeiro, causando doenças como otite média, pneumonia, sinusite e meningite. Um fator de virulência importante do pneumococo é a proteína PspA, uma molécula exposta capaz de interagir com diferentes componentes da resposta imune inata. Estudos do nosso grupo demonstraram que a proteína PspA é capaz de inibir a ação bactericida da lactoferrina e indolicidina – duas proteínas pertencentes à classe dos peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs). Estes peptídeos atuam desestabilizando a membrana plasmática dos microrganismos, causando sua ruptura. Outro peptídeo catiônico com mecanismo de ação semelhante é HNP-1, uma defensina presente nos grânulos de neutrófilos. O papel da proteína PspA na ação da HNP-1 sobre o pneumococo ainda não foi descrito. **Objetivo:** o presente estudo tem como objetivo avaliar o papel da PspA na ação bactericida de HNP-1. **Metodologia:** inicialmente foi comparada a ação da HNP-1 em pneumococos selvagens e mutantes que não expressam PspA. Em seguida, foi realizado ensaio bactericida na presença de anticorpos anti-PspA. Também foi investigado o efeito protetor da cápsula, comparando-se pneumococos selvagens e mutantes sem cápsula. **Resultados:** observou-se aumento na sensibilidade de pneumococo mutante que não expressa PspA ao tratamento com HNP-1, ocorrendo número maior de mortes. Ao adicionar PspA recombinante, houve diminuição do número de mortes. De forma interessante, a adição de anticorpos anti-PspA foi capaz de ampliar o efeito bactericida de HNP-1. De forma semelhante, a ausência da cápsula resultou em maior sensibilidade à ação do AMP, em bactérias de dois sorotipos capsulares diferentes. Para pneumococos selvagens de sorotipos diferentes, encontramos repostas diferentes ao tratamento com HNP-1, indicando que o conteúdo capsular interfere na sensibilidade ao peptídeo. **Conclusão:** Em conjunto, os dados deste trabalho contribuem para esclarecer o papel de PspA e da cápsula polissacarídica na proteção da bactéria contra a ação de HNP-1, mostrando que tanto PspA, como a capsula são de extrema importância para o pneumococo, atuando na proteção da bactéria e na imunidade inata do hospedeiro.

Palavras-chaves: *Streptococcus pneumoniae*. Vacina pneumocócicas. Sorogrupo. Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos. Defensinas.

ABSTRACT

Introduction: *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is a bacterium of great clinical importance, responsible for one million deaths annually worldwide. The pathogen infects the host through the upper airways, where it establishes itself as an asymptomatic colonizer of the nasopharynx. Under certain conditions, the bacterium gains access to other tissues of the host, causing diseases such as otitis media, pneumonia, sinusitis and meningitis. An important virulence factor in pneumococcus is PspA, an exposed protein capable of interacting with different components of the innate immune response. Studies by our group have shown that PspA protein is capable of inhibiting the bactericidal action of lactoferrin and indolicidin - two proteins belonging to the class of cationical antimicrobial peptides – CAMPs on pneumococci. These peptides act destabilizing the plasma membrane of microorganisms, causing their rupture. Another cationic peptide with a similar mechanism of action is HNP-1, a defensin present in neutrophil granules. The role of PspA in the action of HNP-1 on pneumococcus has not yet been described. **Objective:** the present study aimed to evaluate the role of PspA in the bactericidal action of HNP-1. **Methodology:** Initially, the action of HNP-1 on wild type pneumococci and mutants that do not express PspA was compared. Then, a bactericidal assay was performed in the presence of anti-PspA antibodies. The protective effect of the capsule was also investigated, comparing wild type and capsule-negative pneumococci. **Results:** an increase in the sensitivity of mutant pneumococcus that does not express PspA to treatment with HNP-1 was observed, with a greater number of deaths. By adding recombinant PspA, there was a decrease in the number of deaths. Interestingly, the addition of anti-PspA antibodies was able to amplify the bactericidal effect of HNP-1. Similarly, the absence of the capsule resulted in greater sensitivity to the action of AMP in bacteria of two different capsular serotypes. For wild pneumococci of different serotypes, we found different responses to treatment with HNP-1, indicating that capsular content interferes with sensitivity to the peptide. **Conclusion:** Taken together, the results indicate that both *pspA* and capsule contribute to pneumococcal resistance against HNP-1, contributing to escape from early immune responses within the host.

Keywords: Streptococcus pneumoniae. Pneumococcal Vaccines. Serogroup. Antimicrobial Cationic Peptides. Defensins.

LISTA DE ABREVIACÕES

aa	Aminoácidos
ALF	Apolactoferrina
BSA	do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAMPs	Peptídeos antimicrobianos catiônicos
CPS	Polissacarídeo capsular
D.O. _{600nm}	Densidade óptica = a 600nm
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
HNP	Peptídeo de neutrófilo humano
HPV	Papilomavirus humano
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
PspA	Proteína de superfície de pneumococo A
OMS	Organização Mundial da Saúde
THY	Meio Todd Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
µg	Microgramas
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Família e subfamílias dos peptídeos antimicrobianos.....	15
FIGURA 2. Sequência de aminoácidos e o emparelhamento das ligações de dissulfeto nas cisteínas de HNP-1.	15
FIGURA 3. Sequência de aminoácidos das defensinas proHNP-1 e HNP-1.....	16
FIGURA 4. Maturação de defensinas.....	17
FIGURA 5. Ligações e domínios da Proteína de superfície de pneumococo A (PspA) na parede bacteriana.	23
FIGURA 6. Efeito da PspA na ação bactericida do HNP-1	28
FIGURA 7. Efeito da adição de PspA recombinante na ação bactericida do HNP-1 sobre pneumococos	29
FIGURA 8. Efeito dos anticorpos anti-PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre pneumococos	30
FIGURA 9. Efeito da cápsula na resistência de pneumococos ao HNP-1.....	31
FIGURA 10. Efeito da cápsula na resistência de pneumococos ao HNP-1	32
FIGURA 11. Efeito de diferentes capsulas na resistência de pneumococo ao HNP-1.....	33

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1. Isolados de pneumococo utilizados neste estudo.....	25
---	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1	Streptococcus pneumoniae.....	12
1.2	Peptídeos Antimicrobianos	14
1.3	HNP	16
1.4	Mecanismo de ação antimicrobiana das defensinas.....	18
1.5	Modulação imunológica pelos CAMPs	20
1.6	Outros mecanismos de ação das defensinas.....	20
1.7	Concentração	21
1.8	Mecanismos de resistência a CAMPs em pneumococos	21
1.9	Interferência da Cápsula	22
1.10	PspA.....	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Aspectos Éticos	25
3.2	HNP	26
3.3	Cultivo bacteriano.....	26
3.4	Preparo da suspensão bacteriana para ensaio bactericida	27
3.5	Ensaio de morte bacteriana por ação do HNP-1	27
3.6	Efeito da cápsula sobre a ação bactericida do HNP-1	28
3.7	Efeito da PspA na ação bactericida de HNP-1 sobre o pneumococo	28
3.8	Efeito da adição de PspA recombinante na ação bactericida de HNP-1.....	28
3.9	Efeito dos anticorpos Anti-PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo.....	28
3.10	Análise estatística	29
4.	RESULTADOS	29
4.1	Efeito da PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo	29
4.2	Efeito da adição de PspA recombinante na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo.....	30

4.3	Efeito dos anticorpos Anti-PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo.....	31
4.4	Efeito da cápsula sobre a ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo ...	32
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS	53
	Anexo I: Aprovação da CEUA.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae é um patógeno humano de suma importância, responsável por causar diversas infecções na população, como pneumonia, sinusite, otite média e meningite (MASUDA et al., 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), *S. pneumoniae* é uma das bactérias com maior índice de mortalidade no mundo, se não forem diagnosticadas precocemente nem tratadas corretamente doenças pneumocócicas podem causar muitas mortes, além de gerar enormes danos à saúde pública (OMS, 2021).

Mortes por doença pneumocócica acometem especialmente crianças com idade inferior a 5 anos, idosos e alguns grupos de risco, como os infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV+)(BEREZIN et al., 2002). Pneumonia é a maior causa infecciosa de morte em crianças em todo o globo. De acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS, 2021) a pneumonia matou mais de 700 mil crianças menores de 5 anos em 2019, representando 14% de todas as mortes de crianças menores de cinco anos. Só na América Latina e Caribe foram quase 28 mil mortes por ano. Enquanto a maioria das crianças saudáveis naturalmente podem combater a infecção com suas defesas, crianças cujos sistemas imunológicos estão comprometidos tem maior risco de desenvolver pneumonia. O sistema imunológico de uma criança pode ser enfraquecido por desnutrição ou subnutrição, especialmente em bebês que não são exclusivamente amamentados com leite materno.

O pneumococo comumente coloniza a nasofaringe, e esses eventos de colonização precedem todas as doenças causadas por este patógeno, assim a mucosa da nasofaringe atua como um reservatório para a transmissão bacteriana (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004; SIMELL et al., 2012). Além do número significativo de infecções mortais, infecções pneumocócicas não letais também estão associadas a alta morbidade e custos socioeconômicos (ENGHOLM et al., 2017).

Nos EUA, uma das causas mais frequentes causas de hospitalização de crianças é a pneumonia (LEYENAAR et al., 2016). Na pneumonia adquirida pela comunidade, os patógenos mais comuns identificados foram *M. pneumoniae* e *S. pneumoniae*, sendo que o *Streptococcus* foi identificado apenas entre os pacientes já internados, ou seja, em estado grave (YUN et al., 2022).

A resistência a antimicrobianos é considerada na atualidade um dos problemas mais danosos para a saúde pública mundial. Anualmente aproximadamente 4 milhões de pessoas adquirem infecções ligadas a cuidados de saúde, só na Europa estima-se que 37.000 indivíduos morrem por infecções resistentes adquiridas em ambientes hospitalares. Em sua maioria (67,6%) foi provocada por bactérias multirresistentes a antibióticos (CDC, 2018).

Com o aumento da resistência dos pneumococos aos antimicrobianos, ocorre a diminuição na eficácia da terapia com antibióticos convencionais, resultando em tratamentos mais prolongados, aumento na mortalidade e despesas financeiras com tratamento. Avalia-se que em 2050 mais de 10 milhões de pessoas perderão suas vidas anualmente por infecções causadas por cepas resistentes, além da economia global perder cerca de 100 trilhões de dólares devido a este problema (O'NEILL, 2016).

Prevenir doenças causadas por *S. pneumoniae* em crianças é uma estratégia essencial para reduzir a mortalidade infantil. A imunização contra o pneumococo é a forma mais eficaz de prevenir potenciais doenças como a pneumonia. A alimentação adequada é extremamente importante para melhorar as defesas naturais das crianças, além de ser eficaz na prevenção da pneumonia, começando pelo aleitamento materno nos primeiros 6 meses de vida (OMS, 2021).

As vacinas são uma estratégia eficaz na prevenção de doenças pneumocócicas, porém sua cobertura é limitada aos sorotipos bacterianos incluídos nas formulações, que representam apenas uma fração dos pneumococos na população, atualmente, as vacinas com maior cobertura incluem apenas 13 dos mais de 90 sorotipos conhecidos de *S. pneumoniae* (KLUGMAN, 2011). A cápsula é um importante marcador epidemiológico para rastreamento de infecções pneumocócicas e constitui a base das formulações vacinais disponíveis contra esse microrganismo. A Organização mundial da Saúde classifica duas vacinas pneumocócicas conjugadas como opção disponível em várias partes do globo, a 10-valente (PCV10) e a 13-valente (PCV13), existe também a 7-valente (PCV7) mas a mesma está sendo retirada do mercado progressivamente ao longo dos anos, assim a partir da introdução da vacina conjugada 7-valente em 2000, seguida pela versão 13-valente em 2010, a doença pneumocócica invasiva em crianças de 5 anos reduziu eficientemente em até 93% nos Estados Unidos, no Brasil as vacinas pneumocócicas fazem parte da rotina do Programa Nacional de Imunizações (CDC, 2018).

As vacinas pneumocócicas aprovadas e utilizadas até os dias de hoje possuem alto impacto na saúde humana e são de suma importância. Porém, este mesmo impacto induziu mudanças na população bacteriana através da adaptação de *S. pneumoniae* por pressão seletiva, levando à substituição do sorotipo, o que somado ao constante aumento de bactérias multirresistentes elevou este patógeno ao status de um grande problema de saúde pública. É preciso desenvolver novas vacinas capazes eliminar um amplo espectro de sorotipos, e que também sejam acessíveis a todos os países. Algumas possibilidades de desenvolvimento surgem pela frente, partindo desde vacinas baseadas em proteínas e células inteiras, passando por vacinas de mRNA e chegando nos vetores virais, que se fizeram possíveis ao longo da pandemia da COVID-19. Portanto, é possível esperar uma nova geração de vacinas pneumocócicas (OLIVEIRA et al., 2021).

Os peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) surgem como opção ao desafio encontrado com a resistência aos antibióticos, com sua combinação única de efeitos antiinflamatórios, antimicrobianos e imunoestimulatórios. Os CAMPs possuem sua toxicidade diminuída e eficácia de amplo espectro, com o potencial de melhorar a terapia da sepse bacteriana, viral e de combater o número crescente de bactérias resistentes aos antibióticos estabelecidos (MARTIN et al., 2015).

1.2 Peptídeos Antimicrobianos

O primeiro mecanismo de defesa inata do hospedeiro contra infecções invasivas por *S. pneumoniae* é realizado por peptídeos antimicrobianos catiônicos produzidos nas mucosas e outros tecidos do hospedeiro (DRIJKONINGEN; ROHDE, 2014). Os CAMPs são um conjunto de mais de 3000 moléculas diferentes produzidos por diversos seres vivos (WANG; LI; WANG, 2016), em humanos e outros mamíferos. As duas principais famílias de peptídeos antimicrobianos são as catelicidinas e as defensinas (OUELLETTE et al., 1989) (Figura 1).

De modo geral, todas as defensinas humanas possuem capacidade de atuar como antimicrobianos, matando ou inativando uma variedade de bactérias, vírus, fungos e protozoários (COBO; CHADEE, 2013; YEAMAN; YOUNT, 2003). Estes peptídeos catiônicos são estabilizados por três pontes dissulfeto, sua estrutura madura contém 29-35 aminoácidos para as α -defensinas e 38-42 nas β -defensinas (WHITE; WIMLEY; SELSTED, 1995) (Figura 1), constituem 30 a 50% do conteúdo dos grânulos azurófilos de neutrófilos e são ativos contra uma

série de bactérias, fungos e vírus envelopados (JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E., 2006).

Os componentes dos CAMPs assim como seu nível de expressão, variam espacialmente entre locais e tecidos do corpo, entre diferentes respostas imunes, além de evidências de que os níveis de expressão de CAMPs podem variar de indivíduo para indivíduo (JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W., 2006; RIVAS-SANTIAGO et al., 2009).

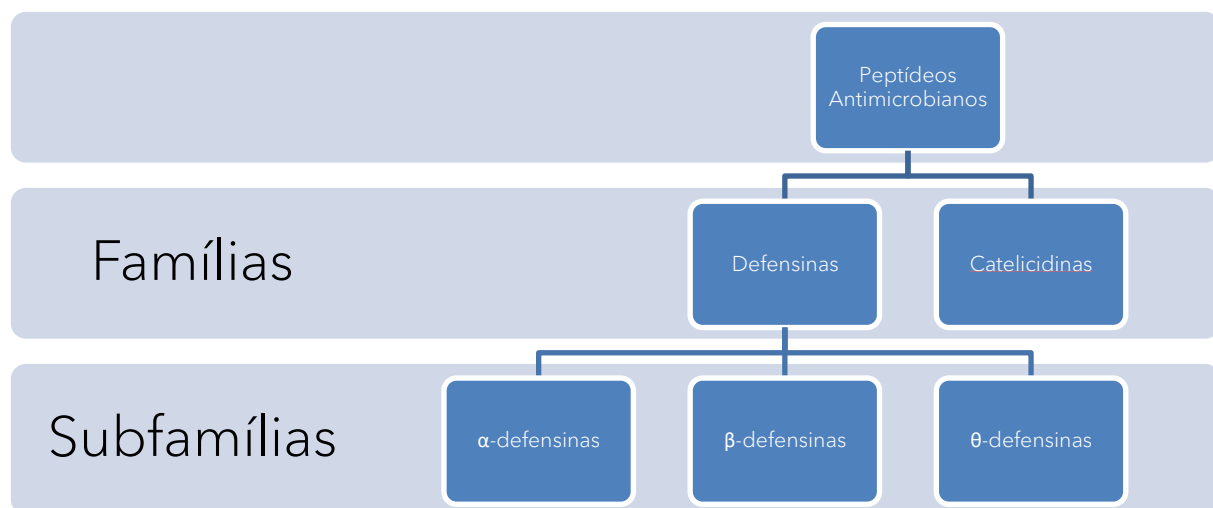


FIGURA 1. Família e subfamílias dos peptídeos antimicrobianos. Os CAMPs são divididos em duas famílias: defensinas e catelicidinas e as defensinas são classificadas em três subfamílias: defensinas, defensinas e defensinas.

Peptídeos encontrados em leucócitos humanos foram denominados "defensinas", com base na sua função de defesa do hospedeiro (OUELLETTE et al., 1989). As defensinas em humanos são classificadas em duas famílias, as α -defensinas e as β -defensinas. As α -defensinas são produzidas em neutrófilos e células de Paneth do intestino delgado, enquanto β -defensinas são expressas por células epiteliais em vários locais. Além disso, existe uma terceira família de defensinas encontradas em primatas não humanos, denominadas θ -defensinas (GANZ, 2003) (Figura 1). Ao todo, existem seis tipos de α -defensinas descritas até o momento: as que tem origem em grânulos de neutrófilos (HNPs1–4) e aquelas encontradas em células Paneth (HD5 e HD6), assim como outras quatro β -defensinas (HBD1-4), que derivam de células epiteliais (MOROMIZATO *et al.*, 2014; REHAUME; HANCOCK, 2008) (Figura 2).

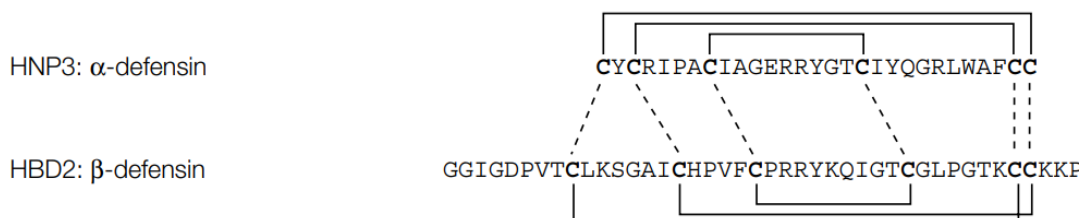


FIGURA 2. Sequência de aminoácidos de duas defensinas o emparelhamento das ligações de dissulfeto nas cisteínas. Tanto as α como β defensinas apresentam um arranjo molecular relativamente compacto, estabilizadas por três ligações dissulfídicas intramoleculares. No entanto, o padrão de formação de ligações dissulfeto é único para cada família das defensinas. De fato, as α defensinas são ligadas pelas cisteínas 1-6, 2-4 e 3-5, enquanto as β -defensinas são conectadas pelas cisteínas 1-5, 2-4 e 3-6. Fonte: figura adaptada de (GANZ, 2003).

1.3 HNP

As α -defensinas HNP 1-3 são inicialmente traduzidas em uma molécula precursora de 94 aminoácidos (aa), distribuídos em: i) uma sequência sinal com 19-aa, ii) uma região N-terminal aniônica de 45-aa e iii) uma sequência de 29-30-aa que correspondem ao peptídeo catiônico maduro. A sequência sinal é removida no retículo endoplasmático, a pró-proteína é sequencialmente clivada com a remoção do fragmento amino terminal para então formar o peptídeo maduro (YEAMAN et al., 1998) (Figura 3). HNPs1-3 compõem um conjunto de peptídeos altamente homólogos, tendo a única diferença em seu aminoácido terminal, NH₂. Mesmo com alta similaridade em sua conformidade, alguns estudos mostram dissimilaridades em seus efeitos antimicrobianos e nas ações imunomoduladoras (BOWDISH; DAVIDSON; HANCOCK, 2006).

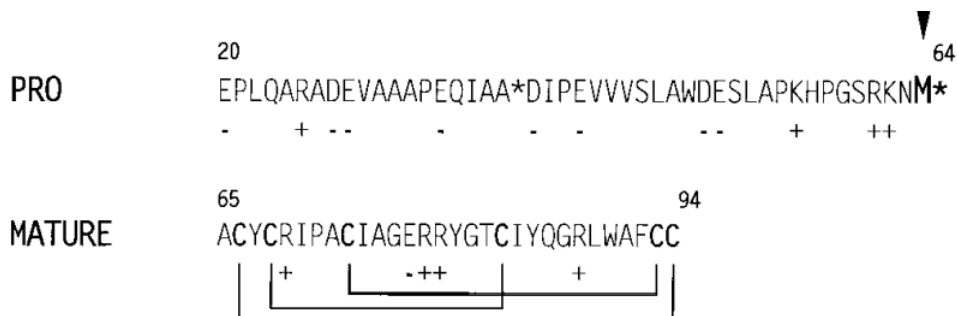


FIGURA 3. Sequência de aminoácidos das defensinas proHNP-1 e HNP-1. A pró-proteína é sequencialmente clivada de seu terminal amino para gerar o peptídeo de defensina maduro HNP-1. Fonte: figura adaptada de (VALORE; MARTIN; HARWIG; GANZ, 1996).

A síntese das α - defensinas acontece na medula óssea, nos promielócitos, células precursoras de neutrófilos. Na figura 4 ilustra a forma ribossômica sintetizada por um precursor chamado preprodefensina que contém 94 aminoácidos (em rosa na imagem); em sua conversão para prodefensina (em roxo na imagem) é feita a remoção da sequência de sinal de 19 aminoácidos N-terminal e por último acontece um novo encurtamento proteolítico N-terminal transformando o peptídeo, assim passando a ser uma defensina madura contendo 29-30 aminoácidos (em vermelho na imagem). Estes peptídeos antimicrobianos são embalados em grânulos primários (azurófilos), com seu amadurecimento na medula óssea é montado um arsenal de grânulos e assim os neutrófilos param a síntese de grânulos, os mesmos são liberados no sangue com destino aos tecidos. Durante a fagocitose estes grânulos ricos em defensina juntam aos vacúolos fagocíticos nos quais geram altas concentrações de defensinas gerando a morte do agente agressor (Figura 4). A produção e a liberação das defensinas são reguladas por diversos sinais: i) sinais microbianos, ii) citocinas e iii) sinais neuroendócrinos, atendendo a demanda específica de cada tecido. Após a produção, estes peptídeos antimicrobianos são estocados em grânulos primários, chamados azurófilos (COWLAND; BORREGAARD, 1999). No processo de fagocitose, os grânulos primários ricos em defensinas se ligam aos vacúolos fagocíticos, gerando altas concentrações de defensinas, para auxiliar na eliminação de microrganismos (JOINER et al., 1989).

As defensinas de neutrófilos humanos HNP 1-3 formam 30% das proteínas dos grânulos azurófilos microbicidas dos neutrófilos (YEAMAN et al., 1998). A diferença do conteúdo de uma proteína para um grânulo azurófilo, se dá em consequência do perfil das proteínas do grânulo sintetizadas no instante em que o grânulo foi formado, assim, diferentes subconjuntos de grânulos surgem, a partir da síntese de peptídeos em diferentes estágios de maturação da célula em desenvolvimento (BORREGAARD et al., 1995; SØRENSEN et al., 1997).

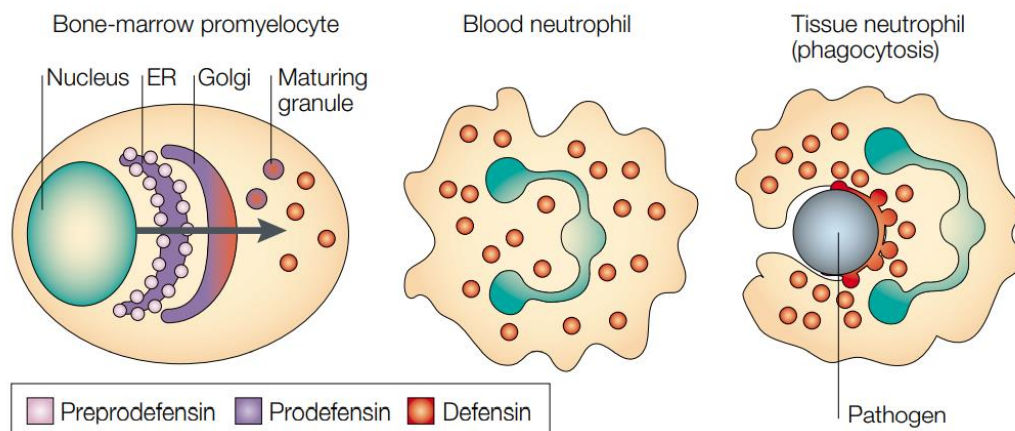


FIGURA 4. Maturação das defensinas. A síntese de defensinas maduras em neutrófilos humanos (HNP-1–3) acontece em promielócitos e mielócitos iniciais, que são precursores da medula óssea durante seu estágio de diferenciação Fonte: figura adaptada de (GANZ, 2003).

Os transcritos para HNP-3 foram encontrados em células mais maduras do que aquelas que sintetizam a maioria das proteínas em grânulos azurófilos e o perfil de mRNA de HNP-3 de fato corresponde em quantidade superior a outras proteínas, como por exemplo a lactoferrina. HNP-3, contudo, não está presente em apenas um grânulo específico, mas em um subconjunto de grânulos azurófilos. Outro dado importante é que a capacidade de retenção do HNP-3 recém-sintetizado diminui à medida que os precursores de neutrófilos amadurecem (ARNLJOTS et al., 1998).

Além da expressão das defensinas em granulócitos, vários epitélios também secretam estes peptídeos em suas superfícies mucosas (DIAMOND; BEVINS, 1998). Células de Paneth representam outra fonte de defensinas: o intestino delgado é revestido por vilosidades absorptivas semelhantes a dedos, intercaladas com criptas de pequenas cavidades estreitas contendo um amontoado de células de Paneth, abastecidas com defensinas em sua parte interior. Os grânulos das células Paneth possuem altas concentrações de pró-defensinas, formada por um segmento aniônico unido ao fragmento maduro e tripsina. Após a degranulação das células Paneth, a tripsina ativa a defensina por clivagem, em um processo induzido pela entrada de bactérias no lúmen intestinal (SALZMAN et al., 2003).

1.4 Mecanismo de ação antimicrobiana das defensinas

A maioria dos antibióticos utilizados atualmente são substâncias descobertas há mais de 80 anos. Com a evolução dos patógenos, o aumento da resistência a tratamentos com antibióticos

convencionais, tornou a busca por antibióticos alternativos uma prioridade para o tratamento de cepas resistentes. Desta forma, os peptídeos antimicrobianos vêm sendo propostos como possíveis candidatos antimicrobianos, uma vez que sua ação é significativamente diferente dos antibióticos convencionais (LEWIS, 2013; OMARDIEN; BRUL; ZAAT, 2016).

Estudos da década de 1960 em lisados de células leucocitárias, definiram que estes lisados possuíam alta atividade antimicrobiana por sua mobilidade eletroforética catódica, atraindo assim a atenção devido à sua abundância e seu amplo espectro de atividade antimicrobiana (GANZ et al., 1991). Em mamíferos, a morte não oxidativa de patógenos fagocitados por células de origem mieloide é realizada por peptídeos antimicrobianos (LEHRER; GANZ; SELSTED, 1991).

As defensinas eliminam células bacterianas por permeabilização da membrana celular, seguida por ações adicionais que resultam em progressão irreversível para as células afetadas (YEAMAN et al., 1998). A permeabilização da membrana coincide com a inibição da síntese de RNA, DNA e proteínas, assim diminuindo a viabilidade bacteriana, indicando que a permeabilização pelos peptídeos antimicrobianos é essencial para a morte da bactéria (LICHTENSTEIN, 1991). Os peptídeos antimicrobianos catiônicos penetram na membrana utilizando-se dos potenciais transmembrana gerados por células e campos eletrostáticos locais (GANZ et al., 1992). O efeito lítico dos peptídeos ocorre em duas etapas: (i) ligação na superfície da célula e (ii) permeabilização da membrana. Em grande parte desestruturados em solução, peptídeos dobram-se ao ligar-se à membrana alvo; uma vez inserido, o peptídeo perturba a função da barreira celular. A permeabilização da membrana leva a um rompimento do potencial transmembrana e dos gradientes de íons, causando vazamento de conteúdo celular, resultando por fim na morte celular (DATHE; WIEPRECHT, 1999). As defensinas em sua maioria, são moléculas anfipáticas que possuem dois grupos de cadeias: i) laterais de aminoácidos carregadas positivamente, ii) cadeias laterais de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 2). Essa formação permite que eles interajam com as membranas microbianas, atuando em seus grupos principais de fosfolipídios carregados negativamente e cadeias de ácidos graxos hidrofóbicos. A eletrostática e o campo bioelétrico transmembrana atraem os peptídeos para dentro da membrana bacteriana; à medida que as moléculas de peptídeo se acumulam, a membrana é tensionada e os peptídeos agem reduzindo a tensão, resultando na formação de poros (HUANG, 2000; LOHNER et al., 1997; SHAI, 1999). Alguns autores não estão convictos de que a membrana é o único alvo dos CAMPs,

ou se o peptídeo atravessa a membrana e chega ao citoplasma/núcleo onde interfere com funções celulares fundamentais, como a síntese de DNA e RNA (OMARDIEN; BRUL; ZAAT et al., 2016). Em *E. coli* por exemplo, as defensinas atuam bloqueando a timidina, uridina, a captação de leucina e também inibem a síntese de β -galactosidase periplasmática, evidenciando outro mecanismo de ação inibindo a síntese de DNA, RNA e proteína (LEHRER et al., 1989).

A alta eficácia antimicrobiana da defensina atinge a membrana mediada por canal, este mecanismo é dado como tóxico a bactéria. Em geral, todos os organismos sensíveis às defensinas possuem membrana plasmática, enquanto os vírus não envelopados são resistentes, assim os canais se formam apenas em membranas e através de tensões negativas que correspondem às voltagens que as moléculas das defensinas encontrariam na membrana da célula-alvo (KAGAN et al., 1990). Além da ação microbicida direta foi demonstrado que os HNPs opsonizam diferentes bactérias, promovendo seu reconhecimento e eliminação por fagócitos como neutrófilos e macrófagos teciduais (SOEHNLEIN et al., 2004).

1.5 Modulação imunológica pelos CAMPs

Além da potente atividade antimicrobiana direta, HNP 1-3 também apresentam importantes efeitos imunomodulatórios. Induzem a quimiotaxia de vários tipos de células imunes, como monócitos, células dendríticas imaturas e linfócitos CD4+ e CD8+, promovem a fagocitose de microrganismos patogênicos, ativam a produção de diversas citocinas, incluindo IFN- λ , IL-6 e IL-10 de células T, bem como TNF- α e IL-1 (GANZ, 2003). A produção de TNF- α contribui para a maturação das células dendríticas, promovendo a integração entre as respostas imunes inatas e adaptativas (SUAREZ-CARMONA et al., 2015). Os HNPs aumentam a expressão de CD40 e coestimuladores B7 pelas células B, estimulando a interação entre células B e T (LILLARD et al., 2008). As propriedades imunoestimulatórias das defensinas também incluem a cicatrização de feridas e a estimulação da angiogênese (EASTON et al., 2009; NIYONSAB et al., 2007).

1.6 Outros mecanismos de ação das defensinas

A capacidade das defensinas de bloquear patógenos virais transmissíveis sexualmente, como HIV, HPV e vírus herpes, propõe que estes peptídeos também podem ser interessantes candidatos antivirais. Algumas defensinas estendem suas funções, podendo apresentar atividade antiviral,

agindo nas células acometidas pelos vírus. Os HNPs interagem com os receptores da superfície celular, podendo assim, bloquear as cascatas de sinalização intracelular, resultando na inibição da replicação ou na transcrição viral. As defensinas também podem ser candidatas a potenciais agentes terapêuticos em doenças relacionadas com a neovascularização, como a angiogênese retinal induzida por hipóxia, observada em pacientes com diabetes, responsável pela perda de visão em adultos (BUCK et al., 2006; GRIGAT et al., 2007; HUBERT et al., 2014; SUAREZ-CARMONA et al., 2015).

1.7 Concentração

Em diversos animais, as maiores concentrações de defensinas encontradas tanto nas organelas de armazenamento de leucócitos, como nas criptas de células de Paneth podem chegar a mais de 10 mg/mL (GANZ, 1987). E em fluidos extracelulares, a concentração de HNPs é quase indetectável em pessoas saudáveis, enquanto os níveis séricos de HNPs podem chegar em concentrações de até 100 mg/mL nos casos de sepse ou meningite bacteriana; esta resposta exacerbada de HNPs é uma consequência da degranulação de neutrófilos (PANYUTICH et al., 1993). As α -defensinas são bactericidas em concentrações altas (mg/mL) encontradas em grânulos de neutrófilos, mas agem como imunomoduladores em concentrações mais baixas liberadas pela degranulação em locais inflamatórios (JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E., 2006).

As defensinas em sua maioria apresentam uma melhor atividade antimicrobiana quando estão em condições de baixa força iônica e com baixas concentrações de cátions divalentes. Em condições ideais, a atividade antimicrobiana é vista em concentrações tão baixas como 1-10 μ g/mL. Altas concentrações de sais e proteínas plasmáticas no alvo microbiano, podem inibir competitivamente a ação das defensinas (GANZ, 1987).

1.8 Mecanismos de resistência a CAMPs em pneumococos

Peptídeos antimicrobianos são os principais protagonistas na defesa imunológica inata contra bactérias patogênicas. Como esperado, os micróbios desenvolveram várias estratégias para superar a atividade de CAMPs, que lhes permitem colonizar/invadir o hospedeiro de forma eficiente (ASSONI et al., 2020). A resistência bacteriana à ação dos peptídeos está associada à produção de fatores de virulência. Em bactérias gram-positivas, foram observadas alterações na carga iônica da superfície celular, efluxo ativo de CAMPs e a degradação proteolítica destes peptídeos. Outra

estratégia adotada por patógenos pode envolver o aprisionamento destes peptídeos, assim diminuindo a quantidade de peptídeos que chegam à superfície bacteriana. Alguns patógenos secretam proteínas que complexam os CAMPs, neutralizando sua atividade antimicrobiana (ASSONI et al., 2020; NIZET, 2006; PANYUTICH et al., 1993; PESCHEL, 2002).

Em bactérias Gram-positivas, o envelope consiste na parede celular e na membrana citoplasmática (OMARDIEN; BRUL; ZAAT, 2016). As três principais funções da parede bacteriana são: organização da estrutura celular, proteção contra a lise devido ao turgor interno e ancoramento de proteínas de superfície e polissacarídeos (VOLLMER; BERTSCHE, 2008), encontrar um meio de levar a aversão dos peptídeos antimicrobianos a parede bacteriana pode garantir a sobrevivência destes microrganismos (COBO; CHADEE, 2013; YEAMAN; YOUNT, 2003).

Dentre os mecanismos de resistência a CAMPs em pneumococo, dois serão discutidos a seguir, a cápsula e a proteína PspA.

1.9 Interferência da Cápsula

A cápsula polissacarídica compreende um importante fator de virulência em pneumococos, favorecendo a infecção de várias maneiras. Louis Pasteur foi o primeiro a notar a presença do que hoje é reconhecido como a cápsula polissacarídica na superfície de *S. pneumoniae* em 1880 (AUSTRIAN, 1981a; b). Em bactérias gram-positivas, o envelope consiste na parede celular e na membrana citoplasmática (OMARDIEN; BRUL; ZAAT, 2016).

Existem mais de 90 tipos diferentes de cápsulas polissacarídicas listadas até o momento, seu papel na ação dos CAMPs é controverso e parece ser influenciado pela natureza química dos polissacarídeos. Beiter e colaboradores observaram que cepas de *S. pneumoniae* encapsuladas, são mais sensíveis à ação de HNP 1-3 do que seus mutantes sem cápsula (BEITER et al., 2008; CROSS, 1990). Esse resultado foi observado em três de quatro sorotipos avaliados. O mecanismo proposto envolve o mascaramento dos mecanismos protetores de superfície bacteriana (como a introdução de cargas positivas nos ácidos lipoteicóicos da membrana plasmática) pela presença da cápsula. As cápsulas (CPSs) podem variar extensamente sua composição química, embora a sua maioria seja aniônica. Essas variações podem ser refletidas em diferenças na sensibilidade à ação dos CAMPs. Em outro estudo publicado no mesmo ano, Llobet e colaboradores constataram que cepas de

Klebsiella pneumoniae cultivadas na presença de polissacarídeos purificados de pneumococos apresentam maior resistência à ação de HNPs, um efeito que era dependente da carga negativa da cápsula (LLOBET; TOMÁS; BENGOCHEA, 2008).

Neste mecanismo, CPSs aniônicas livres podem ser mais eficazes na resistência aos peptídeos, pois podem sequestrá-los, reduzindo assim a quantidade de CAMPs que atingem a superfície bacteriana. Esta hipótese foi baseada no fato de que quase todos os peptídeos antimicrobianos são catiônicos, enquanto as cápsulas em sua maioria são aniônicas, portanto, poderia ser esperada uma interação eletrostática entre eles (STRAUS; ATKISSON; GARNER, 1985).

Estudos evidenciaram que existe interferência entre o custo metabólico na produção de cápsulas com a carga superficial das bactérias, assim gerando maior ou menor prevalência das infecções bacterianas. A cápsula não é o único fator que determina a carga superficial da bactéria, pois foi indicado diferentes cargas dentro do mesmo sorotipo de acordo com indicador de potencial zeta. Tal variação pode se dar por diferenças fenotípicas ou genéticas dentro do sorotipo, como a expressão de proteínas de superfície pneumocócicas variáveis que carregam carga positiva, negativa ou ambos (LI et al., 2013).

1.10 PspA

A proteína de superfície de pneumococo A (PspA) faz parte de um grupo de macromoléculas biológicas expostas na superfície bacteriana (KADIOGLU et al., 2008), seu tamanho pode variar de 65 a 99kDa em várias cepas que se localizam nos três domínios principais: N-terminal, alfa-helicoidal, que possui alta concentração de prolina e C-terminal de ligação à colina (LANE et al., 2022).

A PspA é dividida em três famílias de acordo com a sequência de aminoácidos, especificamente os 100 aa's iniciais do terminal N e os 100 aa's finais do terminal C, este fato pode interferir na resposta de anticorpos de proteção contra *Streptococcus* e por esta razão são considerados altamente variáveis entre as famílias. Embora exista uma reatividade cruzada considerável de anticorpos contra diferentes famílias de PspA, a proteção nem sempre é certa em diferentes estirpes, um fato importante a se considerar para elaboração de futuras vacinas. Estas variações são um meio de evadir a resposta imune adaptativa contra a proteína de superfície de

pneumococo A, fornecendo além da variabilidade antigênica, também contribuem com funções ao PspA que afetam sua virulência, fatos importantes que direcionam o desenvolvimento de novas terapias utilizando proteínas de superfície (LANE et al., 2022; ROCHE et al., 2003; VADESILHO et al., 2014).

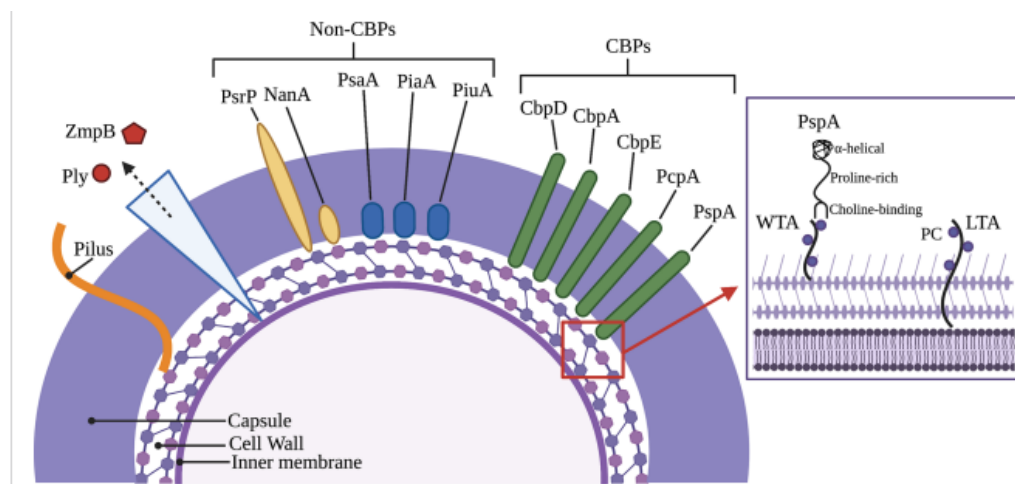


FIGURA 5. Ligações e domínios da Proteína de superfície de pneumococo A (PspA) na parede bacteriana. A imagem inserida mostra a PspA ligada à fosforilcolina (PC) na parede do ácido teicóico (WTA) e do ácido lipoteicóico (LTA) como parte da parede celular e da membrana. Fonte: figura adaptada de (LANE et al., 2022).

PspA já foi avaliada como candidato vacinal em diferentes modelos animais e se mostrou protetora contra infecção sistêmica (sozinha ou combinada a diferentes antígenos bacterianos), capaz de reduzir a colonização da nasofaringe, quando combinada com outras proteínas de pneumococo, como PsaA e PotD (CONVERSO et al., 2020). PspA também já foi avaliada com sucesso em ensaios clínicos (DARRIEUX et al., 2015). O papel de PspA na virulência envolve a redução da deposição do componente C3 do sistema complemento na superfície da bactéria, limitando assim a opsonização e consequente fagocitose (KADIOGLU et al., 2008).

Estudos do nosso grupo demonstraram que o pneumococo é parcialmente resistente à ação de outros peptídeos antimicrobianos como a lactoferrina e indolicidina. Essa resistência foi atribuída à presença de PspA, que impede a ligação dos peptídeos à membrana bacteriana (ANDRE

et al., 2015), portanto, estes dados sugerem que o PspA tem a capacidade de prevenir a ação bactericida de peptídeos catiônicos contra pneumococos, possivelmente ligando-se a essas moléculas através de seus sítios ativos. Este mecanismo de interação foi demonstrado para lactoferrina (SENKOVICH et al., 2007). No entanto, os efeitos desta proteína na ação das defensinas ainda não foram caracterizados. Dessa forma, o presente estudo visa elucidar o papel de PspA na ação bactericida dos HNP 1-3 sobre o pneumococo. O efeito de variações na composição da cápsula polissacarídica também será investigado. Em conjunto, os resultados deste estudo irão contribuir para a elucidação dos mecanismos utilizados pelo pneumococo para evadir a ação antimicrobiana dos CAMPs. Considerando-se o potencial vacinal da proteína PspA, os dados deste trabalho também deverão auxiliar no desenvolvimento de vacinas pneumocócicas mais seguras e com ampla cobertura protetora.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência da proteína PspA na ação bactericida de HNP-1 sobre *S. pneumoniae*.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a ação da HNP-1 em pneumococos selvagem e mutantes que não expressam PspA ou cápsula;
- Avaliar os efeitos da adição de PspA recombinante na ação da HNP-1 sobre pneumococos;
- Investigar o papel de anticorpos anti-PspA na morte de pneumococos na presença de HNP-1.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Os ensaios utilizando soro de animais imunizados com a proteína PspA recombinante foram realizados após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa envolvendo animais de laboratório da USF (CEUA, protocolo 001.06.2019 Anexo I). Foi utilizado soro de animais mantido a -20 °C, que haviam sido imunizados com rPspA 245 (fragmento contendo a porção N-

terminal de uma proteína PspA de família 1, clado 1) ou injetados com adjuvante (AlOH)₃ em solução salina (grupo controle).

3.2 HNP

O presente projeto foi realizado com a utilização de HNP-1 comercial da marca ANASPEC (código AS-60743), que foi diluído em ácido acético + *bovine serum albumin* (BSA) e congelada a -30°C. No momento do uso, o HNP-1 foi diluído em solução tampão fosfato de sódio 10 mM pH= 7,6 estéril.

3.3 Cultivo bacteriano

A tabela 1 sumariza os isolados de pneumococo que foram utilizados neste estudo. As bactérias utilizadas neste experimento são isolados modelos para diversos estudos *in vivo* e *in vitro*, e pertencem ao banco de isolados bacterianos do laboratório de Microbiologia Molecular e Clínica da USF foram mantidas em estoques congelados a -80°C. Na noite anterior a cada experimento, foram semeados em placa ágar sangue 20 µl do estoque congelado da cepa de pneumococo, e a placa foi incubada *overnight* a 37 °C em jarra de anaerobiose.

No dia seguinte, foi observado um crescimento bacteriano na placa de ágar sangue. Com auxílio de um swab estéril com ponta de rayon, os pneumococos foram transferidos para 4-8 mL para meio líquido Todd Hewett contendo 0,5 % de extrato de levedura (THY), iniciando a uma densidade óptica (D.O._{.600nm}) = 0,1 a 0,15. As bactérias foram cultivadas a 37°C até D.O._{.600nm} entre 0,3 – 0,4 (aproximadamente 10⁷ UFC/mL).

TABELA 01. Isolados de pneumococo utilizados neste estudo.

ISOLADO	Clado PspA	Sorotipo	Origem	Observações
D39	2	2	UAB	-
TIGR 4	3	4	UAB	-

JY53	-	2	UAB	Mutante isogênico de D39 que não expressa PspA
AM 1000	2	-	LU	Mutante isogênico de D39 que não expressa cápsula
HR 1001	3	-	LU	Mutante isogênico de TIGR que não expressa cápsula

UAB – Universidade do Alabama, gentilmente cedida pelo Dr David Briles

LU – Lund University, gentilmente cedida pelo Dr Anders Hakansson

3.4 Preparo da suspensão bacteriana para ensaio bactericida

Assim que os cultivos atingiram a D.O._{600nm} desejada, 3 mL do cultivo foram transferidos para microtubos estéreis e as bactérias foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos a 20°C. O sobrenadante foi descartado e as bactérias foram lavadas com igual volume de tampão fosfato de sódio a 10 mM pH=7,6 estéril. O ajuste catiônico foi usado conforme protocolo descrito por (SÁNCHEZ-GÓMEZ et al., 2008; YIN et al., 2012) de forma a obter níveis iônicos semelhantes aos encontrados em tecidos humanos. Após nova centrifugação, as bactérias foram ressuspendidas em 2 mL de tampão fosfato de sódio e submetidas ao tratamento com os peptídeos.

3.5 Ensaio de morte bacteriana por ação do HNP-1

Foi avaliada a sensibilidade de *S. pneumoniae* D39 frente a concentrações decrescentes de HNP-1, sendo: 25 µg/mL e 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 3 µg/mL. Estas concentrações foram selecionadas com base em ensaios preliminares realizados no laboratório de Microbiologia Molecular e Clínica da USF e literatura (BEITER et al., 2008).

O peptídeo HNP-1 foi diluído nas diferentes concentrações em volume final de 50 µl por tubo. Em seguida, 50 µl de suspensão bacteriana foram adicionados a cada tubo. Aos tubos controle foram adicionados 50 µl de solução tampão fosfato de sódio e 50 µl de bactéria.

As amostras foram incubadas a 37 °C durante 1 hora. Ao término da incubação, as amostras foram submetidas à diluição seriada, plaqueadas em ágar sangue e incubadas a 37 °C durante 16-20 h. O número de bactérias sobreviventes ao tratamento foi calculado para cada grupo.

3.6 Efeito da cápsula sobre a ação bactericida do HNP-1

A fim de avaliar a contribuição da cápsula polissacarídica na ação bactericida do HNP-1 sobre os pneumococos, cepas bacterianas selvagem e mutantes isogênicos que não expressam cápsula foram submetidas ao tratamento com HNP-1 conforme descrito no item 3.5 e o número de bactérias sobreviventes foi comparado nos dois grupos.

3.7 Efeito da PspA na ação bactericida de HNP-1 sobre o pneumococo

A fim de avaliar a contribuição da proteína de superfície PspA na ação bactericida dos HNP-1 sobre os pneumococos, cepas bacterianas selvagem e mutante isogênico que não expressa a proteína (JY53) foram submetidas ao tratamento com HNP-1 conforme descrito no item 3.5 e o número de bactérias sobreviventes foi comparado nos dois grupos.

3.8 Efeito da adição de PspA recombinante na ação bactericida de HNP-1

A fim de avaliar o efeito da adição de PspA recombinante na ação bactericida de HNP-1 sobre pneumococos selvagens, a bactéria D39 foi cultivada conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4. Em seguida, foram adicionados 25 µg/mL de HNP-I e 20 µL (correspondendo a 10 µg) de PspA recombinante (rPspA 94) à suspensão bacteriana, e o volume final foi completado para 100 µl com tampão fosfato. A proteína rPspA94 corresponde à porção N-terminal de uma PspA de clado 2 (família 1) (GOULART et al., 2011). O grupo controle foi incubado com 10 µg de BSA (albumina bovina sérica, do inglês, *bovine serum albumin*) e 25 µg/mL de HNP-I. O número de bactérias sobreviventes foi mensurado em cada grupo após plaqueamento e cultivo durante 16 h.

3.9 Efeito dos anticorpos Anti-PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo

A fim de determinar a capacidade dos anticorpos anti-PspA em bloquear uma possível ação protetora contra os efeitos do HNP-1 em pneumococos selvagens, a bactéria D39 foi cultivada conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4. Em seguida, as bactérias foram tratadas com 25 µg/mL de HNP-1 mais 10% de soro anti-PspA 245. O grupo controle foi tratado com HNP-1 e soro de animais

injetados com adjuvante em solução salina. O número de bactérias sobreviventes foi mensurado em cada grupo após plaqueamento e cultivo durante 16 h.

3.10 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em quadruplicatas e repetidos duas vezes. Para avaliação da ação da HNP-1 sobre as cepas de pneumococos selvagens e mutantes, foi utilizado o teste Anova com pós teste de Dunnet. As diferenças na sobrevivência entre bactérias tratadas com proteína recombinante e proteína controle ou com soro controle e anti-PspA foram analisadas por teste t de Student. A significância estatística foi calculada com base em valores de $p \leq 0,05$. Todos os gráficos foram produzidos utilizando o programa GraphPad Prism 8.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo

Inicialmente foi comparada a ação de HNP-1 sobre *S. pneumoniae* selvagem e seu mutante negativo para a expressão da proteína PspA. Para isso, as duas bactérias foram tratadas com concentrações crescentes de HNP-1 (Figura 6). A taxa de morte foi determinada como porcentagem de redução na viabilidade das bactérias, em relação ao grupo controle incubado apenas com solução tampão. Observou-se que na menor dose, de 3 $\mu\text{g/mL}$, houve apenas uma pequena redução (na significativa) na viabilidade da estirpe mutante, enquanto a selvagem se mostrou resistente nessa dosagem. Na bactéria selvagem, se observou uma ação dose dependente do HNP-1, iniciando inibição em 6 $\mu\text{g/mL}$, mostrando uma inibição equivalente para as duas cepas. O tratamento com HNP-1 a partir de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ já induziu uma redução significativa do número de bactérias viáveis em relação ao controle não tratado, para as bactérias selvagens e mutante PspA-negativo. No entanto, observa-se um efeito mais acentuado do peptídeo sobre a cepa mutante, nas concentrações de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e 12,5 $\mu\text{g/mL}$.

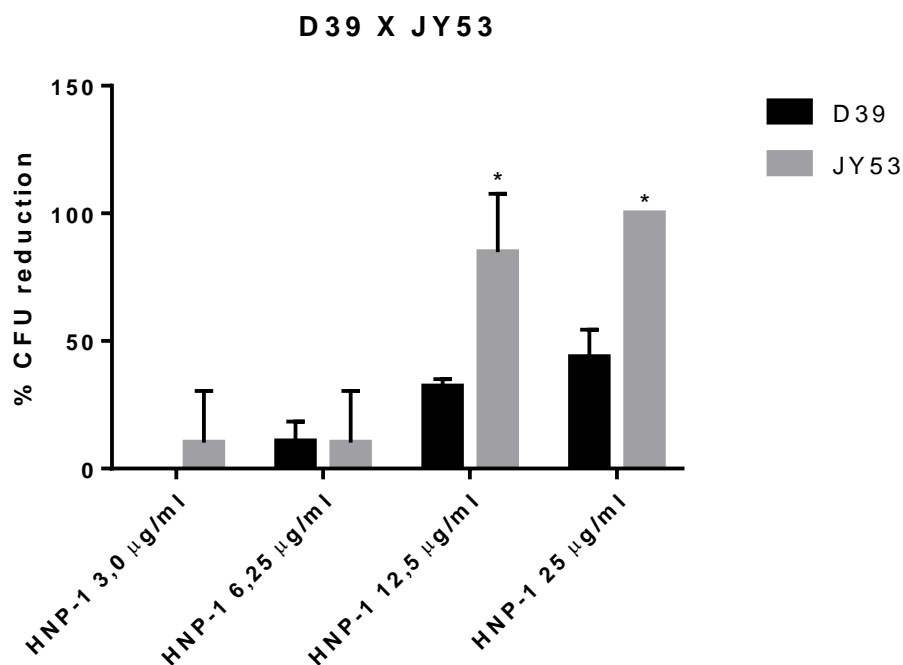


FIGURA 6. Efeito da PspA na ação bactericida do HNP-1. A estirpe D39 selvagem e seu mutante negativo para proteína de superfície de pneumococo A (PspA), JY53, foram tratados com concentrações crescentes de HNP-1, de 3 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 25 µg/mL e plaqueados. A redução percentual da sobrevivência bacteriana é mostrada para cada grupo e concentração em comparação com o controle não tratado. * $p < 0,05$ comparando-se bactéria selvagem e mutante em cada concentração de HNP-1.

4.2 Efeito da adição de PspA recombinante na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo

Para avaliar se o efeito da adição de PspA recombinante poderia interferir na ação bactericida de HNP-1 sobre pneumococos selvagens, as bactérias foram tratadas com 25 µg/mL de HNP-I mais 10 µg de PrpA recombinante (rPspA 94). A proteína rPspA 94 corresponde à porção N-terminal de uma PspA de clado 2 (família 1). A contagem bacteriana indicou que, para o grupo tratado com HNP-1 contendo a adição de PspA recombinante, a sobrevivência foi maior quando comparada à proteína controle (BSA) (Figura 7).

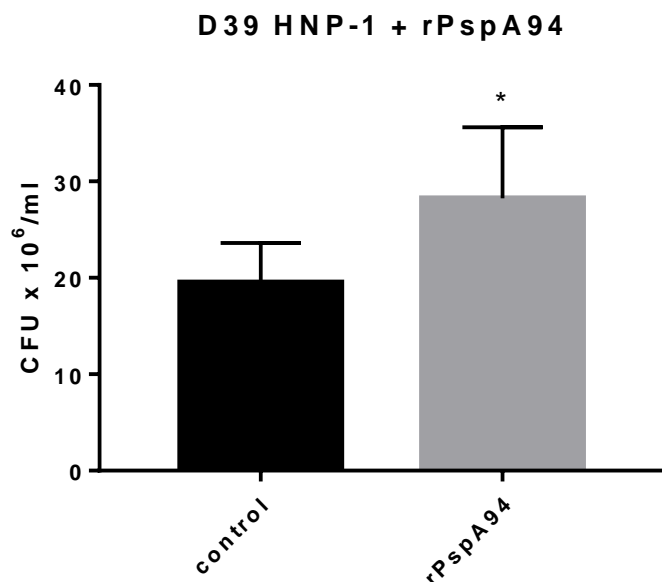


FIGURA 7. Efeito da adição de PspA recombinante na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo. A estirpe D39 selvagem foi tratada com HNP-1 25 µg/mL mais 10 µg de rPspA94 ou 10 µg de proteína controle (BSA, control), e plaqueados. O número de bactérias sobreviventes ao tratamento é mostrado para cada grupo. Os grupos foram comparados usando o teste t de Student. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.3 Efeito dos anticorpos Anti-PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo

A fim de avaliar efeito dos anticorpos Anti-PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo, foram realizados testes com dois grupos tratados com HNP-1 em uma concentração de 12,5 µg/mL, um na presença de 10% de soro de camundongos imunizados com PspA 245 (clado 1, família 1) e outro com soro controle (animais injetados apenas com o adjuvante). A contagem bacteriana indicou que, para o grupo tratado com HNP-1 contendo a adição de soro anti-PspA a viabilidade bacteriana foi menor quando comparada ao soro controle que não continha anticorpos (Figura 8).

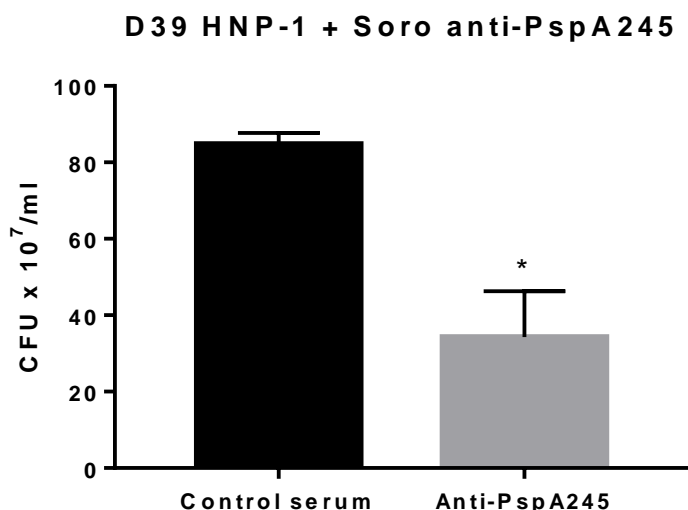


FIGURA 8. Efeito dos anticorpos Anti-PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo. Foi adicionado a estirpe D39 selvagem 10 μ l de soro anti-PspA245 ou 10 μ l de soro controle (de animais injetados com adjuvante em salina) e, após 15 min, os dois grupos foram tratados com HNP-1 a 12,5 μ g/mL e plaqueados. O número de bactérias sobreviventes ao tratamento é mostrado para cada grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.4 Efeito da cápsula sobre a ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo

Em seguida, foi avaliado o efeito da presença da cápsula polissacarídica na ação de HNP-1 sobre pneumococos. Para este ensaio, foram comparadas duas cepas diferentes de pneumococo, D39 sorotipo 2 e TIGR sorotipo 4 e seus mutantes isogênicos não encapsulados correspondentes. A taxa de morte foi determinada após 1 hora de incubação a 37 °C. O grupo controle foi incubado apenas com solução tampão e usado como referência para determinar a porcentagem de morte. O resultado indicou que, para AM 1000, o tratamento com HNP-1 a partir de 6,25 μ g/mL já conseguiu uma redução significativa do número de bactérias viáveis em relação ao controle (Figura 9). Para 12,5 μ g/mL e 25 μ g/mL a redução foi ainda maior, atingindo 100%; já em sua versão selvagem houve uma progressão na taxa de mortalidade se iniciando em 6,25 μ g/mL, passando por 12,5 μ g/mL e chegando em 25 μ g/mL. A taxa de morte pelo peptídeo se mostrou dependente da dose. Este resultado indica que, para bactéria D39, a presença da cápsula contribui para proteção contra a ação de HNP-1,

Em seguida, foi avaliada a cepa TIGR4, que produz cápsula de sorotipo 4 e seu mutante sem cápsula, HR1001. Conforme se observa na Figura 10, as cepas selvagem e mutante apresentaram

resultados equivalentes para as concentrações de 12,5 e 25 $\mu\text{g/ml}$ de HNP-1. Na concentração de 6,25 $\mu\text{g/ml}$ de HNP-1, observa-se uma maior resistência da cepa selvagem em relação à mutante sem cápsula. Esse dado sugere que, na presença de baixas concentrações de HNP-1, a cepa selvagem apresentou maior resistência ao AMP, porém o efeito não se manteve em concentrações mais elevadas do peptídeo.

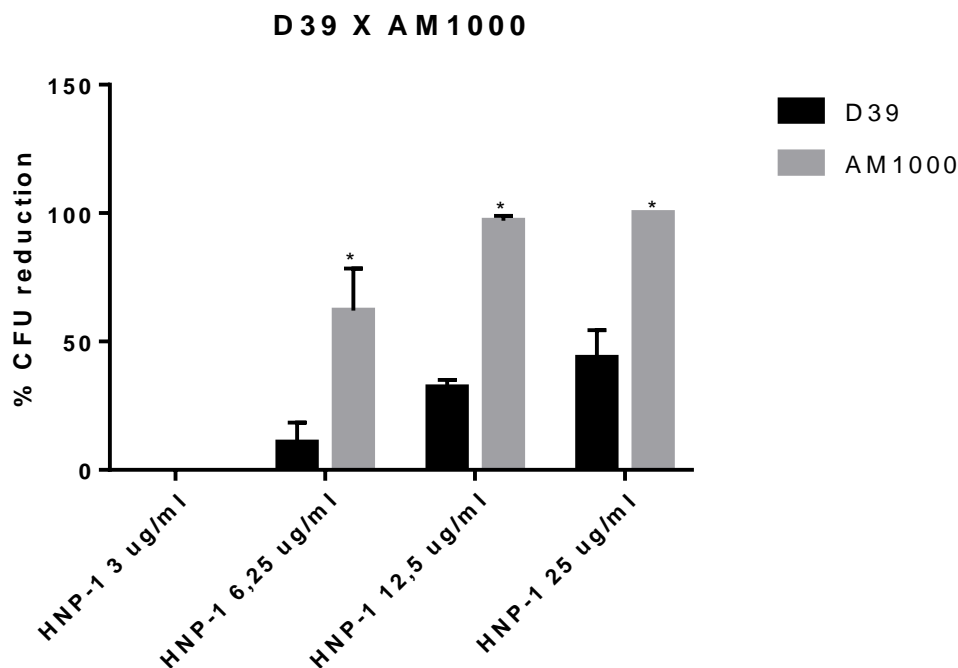


FIGURA 9. Efeito da cápsula na resistência de pneumococos ao HNP-1. A estirpe D39 selvagem e seu mutante negativo para cápsula AM 1000 foram tratados com concentrações crescentes de HNP-1 a 3 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 12,55 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$ e plaqueado. A redução percentual da sobrevivência bacteriana é mostrada para cada grupo e concentração em relação ao controle não tratado. * $p < 0,05$ comparando-se a cepa selvagem e a mutante em cada concentração de HNP-1.

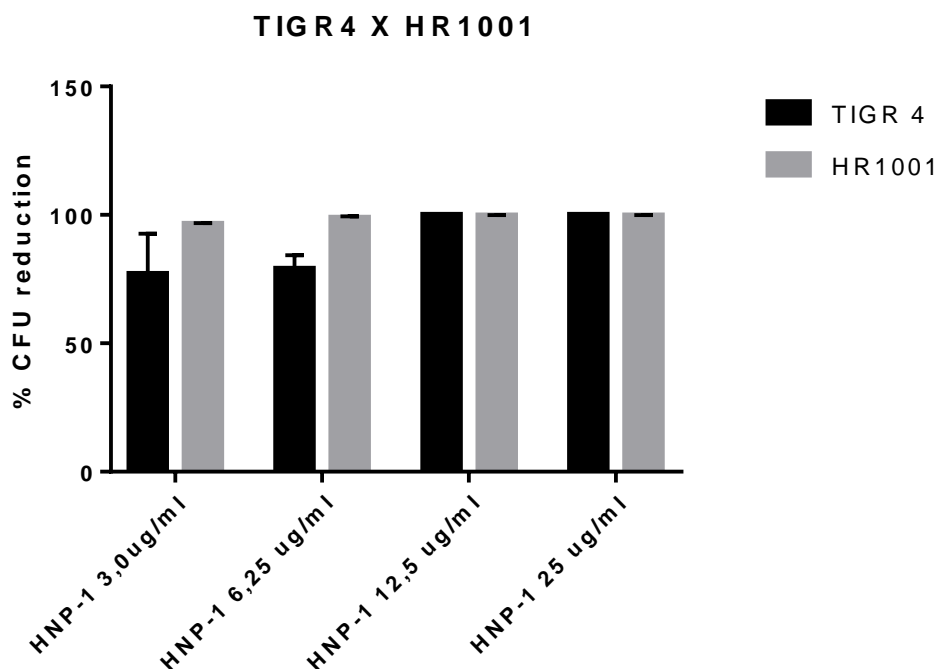


FIGURA 10. Efeito da cápsula na resistência de pneumococos ao HNP-1. A estirpe TIGR4 selvagem e seu mutante negativo para cápsula HR 1001 foram tratados com concentrações crescentes de HNP-1 a 3 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,55 µg/mL e 25 µg/mL e plaqueados. A redução percentual da sobrevivência bacteriana é mostrada para cada grupo e concentração em relação ao controle não tratado.

Nesse caso, a cepa selvagem apresentou uma maior sensibilidade ao peptídeo quando comparada à cepa D39, mesmo nas menores concentrações de HNP-1.

Após encontrar resultados distintos para diferentes sorotipos capsulares, a fim de testar a relação da mudança do conteúdo capsular com a resistência bactericida ao HNP-1, as cepas selvagens D39 (sorotipo 2) e TIGR4 (sorotipo 4) foram comparadas quanto à resistência ao AMP (Figura 11). A cepa D39 foi mais resistente do que TIGR4 a todas as doses avaliadas de HNP-I. TIGR4 teve redução de quase 80% com as doses mais baixas do AMP, de 3 µg/mL e 6,25 µg/mL, atingindo a totalidade em 12,5 µg/mL.

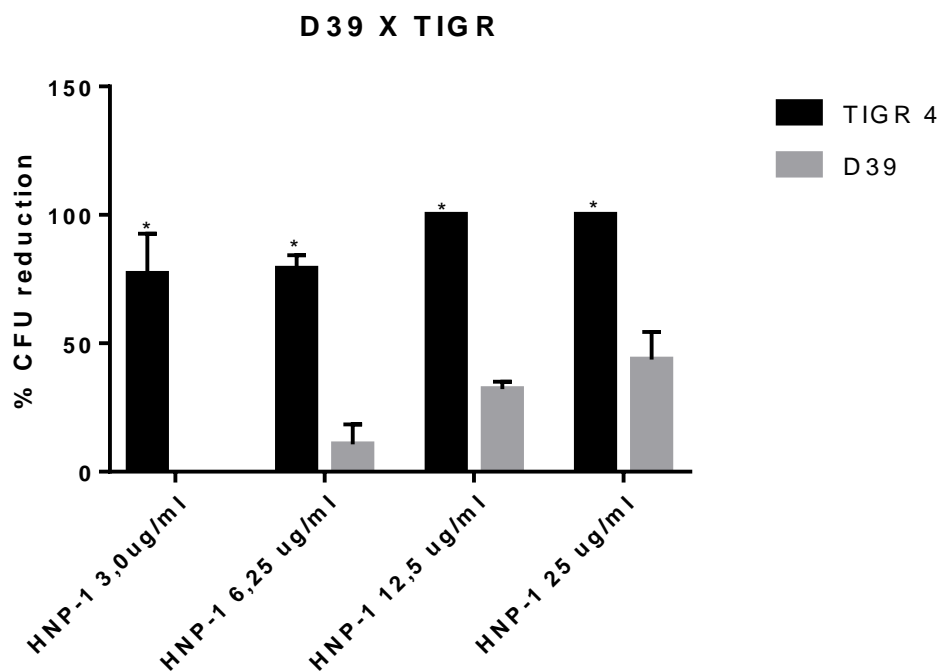


FIGURA 11. Efeito de diferentes capsulas na resistência de pneumococos ao HNP-1. Duas estirpes selvagens D39 e TIGR4 foram tratadas com concentrações crescentes de HNP-1 a 3 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,55 µg/mL e 25 µg/mL e plaqueado. A redução percentual da sobrevivência bacteriana é mostrado para cada grupo e concentração. * $p < 0,05$ em comparação com o controle.

Em resumo, os resultados indicam que a ausência de cápsula resultou em maior susceptibilidade à ação do HNP-1 no mutante de D39, AM1000 (Figura 9), mas não na mutante de TIGR4, HR1001 (Figura 10). Comparando-se a resistência à ação de HNP-1 sobre as duas cepas selvagens, observa-se que a bactéria TIGR4 é mais sensível à morte por HNP do que a cepa D39 (Figura 11).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi investigada a contribuição da proteína de superfície de pneumococo A para a resistência ou suscetibilidade do *S. pneumoniae* contra a ação bactericida do HNP-1, um peptídeo catiônico da família das defensinas. Mesmo com a existência de antibióticos e de vacinas, a infecção pneumocócica ainda continua sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente entre grupos de alto risco (LÓPEZ, 2006; SCHMIDT-IOANAS; LODE, 2006). O surgimento de resistência a antibióticos e limitações da vacina à base de polissacarídeos atualmente disponível, levou a uma busca por novas vias terapêuticas, incluindo a identificação de antígenos proteicos de reação cruzada conservados em sorotipos capsulares para preparação de vacinas (OGUNNIYI et al., 2007; TAI, 2006). A PspA é a potencial candidata a vacina mais intensamente estudada. Sua ação envolve a inibição da ativação e deposição de proteínas do sistema complemento na superfície do pneumococo e inibição da depuração do pneumococo do sangue (REN et al., 2004).

Estudos anteriores sugerem que a proteína PspA interfere na ação de outros peptídeos antimicrobianos. Shaper et. al demonstrou que PspA bloqueia a morte de pneumococos pela ligação à ALF, fato apoiado por estudos do nosso grupo posteriormente Milani mostrou que PspA também inibe a ação da indolicidina sobre o pneumococo. Corroborando estes dados, o presente estudo sugere que PspA também protege a bactéria da ação defensina HNP-1 (ANDRE *et al.*, 2015; MILANI, 2019; SHAPER et al., 2004).

Hakansson et. al demonstrou que PspA, possui um sítio de ligação de lactoferrina localizada na parte C-terminal do domínio α -helicoidal (HÅKANSSON et al., 2001). Posteriormente, foi publicada a estrutura cristalizada do complexo formado pelo domínio de ligação à lactoferrina em PspA e o lobo N da lactoferrina humana (domínio lactoferricina), indicando que a ação da PspA, indicando que a ação protetora de PspA contra o AMP envolve a ligação específica entre as duas moléculas. Neste mecanismo, a ligação de PspA bloqueia o acesso do peptídeo à membrana plasmática da bactéria, prevenindo sua ação bactericida (SENKOVICH et al., 2007).

No presente estudo, a adição de um fragmento recombinante contendo a porção N-terminal de PspA resgatou o pneumococo da ação bactericida de HNP-1, promovendo maior viabilidade bacteriana em relação à BSA. Este resultado apoia a hipótese de que a região N-terminal de PspA é capaz de se ligar, além de outros peptídeos e também a HNP-1. Também reforça a premissa de

que a região N-terminal de PspA é a responsável pela ligação da proteína ao AMP, e que a molécula de PspA solúvel (não aderida à bactéria) é capaz de interferir na ação do HNP-1 sobre o pneumococo.

Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que a PspA não precisa necessariamente estar ligada à superfície pneumocócica para exercer seu efeito protetor contra peptídeos antimicrobianos; naquele estudo fragmentos solúveis de PspA foram capazes de inibir o efeito bactericida da apolactoferrina (ALF) competindo com moléculas de PspA na superfície bacteriana. (ANDRE et al., 2015; SHAPER et al., 2004). O efeito foi observado em pneumococos de diversos sorotipos.

Outro fato a ser considerado, está ligado à concentração molar de PspA necessária ao bloqueio da atividade da ALF; os níveis da proteína de superfície A necessários para impedir a morte por apolactoferrina (ALF) são menores do que a concentração de ALF, indicando que uma molécula de PspA pode se ligar e inibir mais de uma molécula de ALF (SHAPER et al., 2004).

Estudo posterior sugeriu, através de ensaios *in silico* que a energia de ligação negativa indica a ligação favorável de peptídeos derivados da indolicidina com a PspA. Este dado reforça o potencial de PspA para interagir não apenas com lactoferrina, mas também com outros peptídeos catiônicos, sugerindo um possível mecanismo amplo de proteção contra AMPs mediado por PspA. (JINDAL et al., 2015). No entanto, estudos avaliando a afinidade da PspA com o peptídeo HNP-1 serão necessários para determinar se essa ligação também ocorre com a defensina.

A especificidade da ação de PspA foi confirmada em diferentes estudos. Shaper et al. avaliou os efeitos das proteínas PspA, PspC e PcpA na ação da lactoferrina sobre pneumococos, e mostrou que apenas PspA afeta a ação do peptídeo sobre a bactéria (SHAPER et al., 2004). Outras proteínas de superfície do pneumococo, LytA e PgdA, também foram avaliadas quanto a seu efeito na ação bactericida das defensinas; estas proteínas não tiveram efeito na morte de TIGR4 encapsulado pelo CAMP (BEITER et al., 2008).

O mecanismo sugerido para proteção dada por PspA contra os efeitos bactericidas da lactoferrina envolvem a inibição da clivagem de peptídeos bacterianos, impedindo que os CAMPs perturbem a membrana do pneumococo e levem à morte bacteriana (SHAPER et al., 2004). Os resultados deste estudo sugerem que este efeito possivelmente se estende também para HNP-1.

Uma vez confirmada o papel protetor de PspA contra a ação de HNP-I, foi avaliada a influência de anticorpos anti-PspA neste mecanismo. Soro de animais imunizados com PspA aumentou a ação bactericida de HNP-I sobre o pneumococo. Este resultado indica que provavelmente o anticorpo anti-PspA se liga à PspA, e que esta ligação impede a proteína de bloquear a ação bactericida do HNP-1, tornando a bactéria mais sensível ao AMP. Este dado sugere, ainda, um possível mecanismo protetor conferido por vacinas baseadas em PspA. Adição de um efeito semelhante dos anticorpos anti-PspA já foi mostrado por autores para outros peptídeos bacterianos (ANDRE et al., 2015; SHAPER et al., 2004). Foi demonstrado que o anticorpo para PspA pode aumentar a morte de pneumococos por ALF, sugerindo fortemente que o anticorpo para PspA tem a capacidade de proteger o organismo contra a colonização pneumocócica e possivelmente também contra a infecção (SHAPER et al., 2004).

Trabalhos anteriores do nosso grupo testaram a capacidade dos anticorpos anti-PspA em aumentar a taxa de morte mediada por ALF. Foi investigado em quatro cepas de pneumococos de diferentes sorotipos, expressando PspAs de clados 1 a 4. Os resultados indicaram que a maioria dos anti-PspA foram capazes de aumentar a morte pneumocócica por ALF em bactérias que expressam PspA de outros clados e famílias (ANDRE et al., 2015; SHAPER et al., 2004), mostrando que anticorpos se ligam à PspA levando sua inibição, possivelmente bloqueando os sítios de interação entre essas duas proteínas.

Estes dados somados aos encontrados em nossos resultados, reforçam a hipótese de que a ligação dos anticorpos com a proteína de superfície de Pneumococo A, deixam o caminho livre para os CAMPS matarem *S. pneumoniae*.

O papel protetor de anticorpos anti-PspA foi demonstrado *in vivo* por ensaios de colonização experimental em camundongos e voluntários (MCCOOL et al., 2002). Nestes ensaios, a colonização nasal com pneumococos induziu a produção de anticorpos anti-PspA (entre outros) que foram protetores contra recolonização. A vacinação experimental com fragmentos recombinantes contendo a região N-terminal de PspA foi protetora contra o pneumococo, sendo capaz de reduzir as contagens bacterianas na nasofaringe, evidenciando a função protetora dos anticorpos para PspA neste modelo. Foi demonstrado ainda que os anticorpos pré-existentes para

PspA localizado em mucosas podem impedir o transporte da bactéria através das mucosas. (MCCOOL et al., 2002).

O presente estudo também avaliou a influência da cápsula polissacarídica na ação de HNP-I sobre pneumococo. Foram avaliados dois isolados de sorotipos 2 (D39) e 4 (TIGR4) e seus mutantes isogênicos que não produzem cápsula. A bactéria D39 foi mais resistente à ação do AMP do que seu mutante sem cápsula. No entanto, a bactéria TIGR4 apresentou a mesma sensibilidade à ação de HNP-I do que sua mutante não encapsulada. Este resultado sugere que o papel da cápsula na ação de HNP-I varia conforme o sorotipo capsular. No entanto, outros fatores podem contribuir para o efeito protetor. Quando comparadas as duas cepas encapsuladas, TIGR4 foi significativamente mais sensível ao AMP do que D39. Embora esse dado sugira que diferentes cápsulas afetam a ação de HNP-I de diferentes formas, novos estudos usando diferentes sorotipos são necessários para confirmar esse efeito. Resultados apresentados por outros autores indicam que a cepa de pneumococo D39 apresenta elevada resistência à ação bactericida de HNP-1 quando comparada à TIGR4 (BEITER et al., 2008).

Essa variação na resistência de diferentes pneumococos à ação de peptídeos antimicrobianos pode ser causada por variações na estrutura da cápsula ou por outros componentes bacterianos que afetam a ação do CAMP.

Sabe-se que a carga superficial das bactérias pode interferir na atração ou repulsão dos CAMPs, contribuindo com o aumento ou diminuição da taxa de morte. Li et. al utilizou um grupo de cepas construídas em laboratório que compartilham a base genética do TIGR4, mas se diferem no polissacarídeo da cápsula. Eles avaliaram se a cápsula seria determinante para a carga superficial destas cepas. O resultado mostrou que a maioria dos polissacarídeos capsulares (85,8%) com estrutura química conhecida carregam cargas líquidas negativas. Ainda foi testado através de uma modificação experimental se a quantidade de cápsula produzida influencia na carga superficial dentro de um sorotipo. Uma variante TIGR4 que produz uma cápsula tipo 19F foi cultivada em meio glicose, pois este monossacarídeo reduz a produção de cápsulas. As bactérias cultivadas em glicose apresentaram carga maior que a sua estirpe selvagem. Estes dados resultam na hipótese de que cargas superficiais negativas estão associadas com maior sobrevivência de morte não-opsônica por neutrófilos humanos, indicando que a carga superficial negativa favorece a infecção por

pneumococos (Li et al., 2013). Resultado semelhante foi recentemente observado em estudo do nosso grupo avaliando a influência da cápsula na ação da indolicidina (WAZ, 2022). A cepa D39 foi mais resistente a ação do AMP do que sua mutante negativa para cápsula, enquanto em TIGR4, a cepa selvagem foi mais sensível do que a mutante. Ainda de forma semelhante, diferentes sorotipos capsulares apresentaram resistência variável ao AMP, que se correlacionou negativamente com sua carga superficial (potencial zeta). Estes resultados sugerem que a cápsula é um determinante importante da sensibilidade de pneumococos aos AMP.

No entanto, é improvável que a cápsula seja o único fator determinante para a carga superficial da bactéria. Outros fatores do hospedeiro que se ligam à superfície da célula pneumocócica, como IgA, lactoferrina e fator H também podem influenciar na carga e modular a interação com neutrófilos *in vivo* (Li et al., 2013). Outro fator que pode modificar a carga é a variação genética entre cepas e alterações na membrana (KIM; WEISER, 1998; KOVÁCS et al., 2006). Um exemplo é o aumentando da carga positiva da membrana por D-alanilação de ácidos lipoteicóicos, catalisada pelo operon DLT (WARTHA et al., 2007), diminuindo assim a suscetibilidade de CAMPs. Inversamente, a remoção de proteínas de ligação à colina, como LytA, aumenta a suscetibilidade pneumocócica a CAMPs (SWIATLO et al., 2002). O pneumococo também pode alterar sua expressão gênica durante a exposição a CAMPs e aumentar assim sua resistência (MAJCHRZYKIEWICZ JOANNA; KUIPERS OSCAR; BIJLSMA JETTA, 2010). Portanto, tanto o sorotipo quanto o histórico genético associados, desempenham papéis fundamentais e podem determinar a suscetibilidade dos pneumococos aos peptídeos antimicrobianos. A fim de investigar essa relação, outros autores analisaram mutantes para DLT (D-alanilação) encapsulados (TIGR4) e não encapsulados (TIGR4R). Eles concluíram que a deleção de DLT não aumentou a sensibilidade ao HNP1-3 na TIGR4 encapsulada. Contudo, inativando DLT na TIGR4R não encapsulado, houve um aumento acentuado na sensibilidade ao HNP1-3. Assim, a modificação na carga de superfície pela inibição de D-alanina sensibiliza cepas não encapsuladas ao HNP1-3, gerando um efeito bactericida maior das defensinas (BEITER et al., 2008). Os dados acima analisados em conjunto, sugerem que a inserção de carga superficial positiva (via D-alanilação) pode levar à resistência as defensinas.

Outro mecanismo de resistência evidenciado por outros autores se baseia na capacidade dos CAMPs de liberar CPS da superfície bacteriana que, conseqüentemente, aumenta a resistência a

estes peptídeos. Para comprovar tal mecanismo foi utilizado *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Os resultados demonstraram que, mesmo na ausência de CAMPs, as três cepas liberaram CPS para o meio, mas a quantidade de CPS foi superior após incubação dos patógenos com polimixina B ou HNP-1 (LLOBET-BROSSA; TOMAS; BENGOCHEA, 2009). Estes dados juntos apontam que os CAMPs liberam CPS da superfície dos patógenos, se ligando aos peptídeos, reduzindo assim sua atividade bactericida. Estes resultados encontrados nos ajudam a compreender a reduzida taxa de morte mostrada em nosso experimento em doses menores de HNP-1.

Resultados encontrados em literatura demonstram que os CPSs aumentaram a resistência ao HNP-1 em três espécies bacterianas em pelo menos 5 vezes, chegando ser necessário doses de 50 µg/mL de HNP-1 para iniciar o efeito bactericida. Um fato importante a ser considerado é se em organismos vivos haveria CPS livre o suficiente para neutralizar a ação bactericida dos CAMPs. Embora seja difícil estimar o número de bactérias nos pulmões de pacientes infectados com *Klebsiella*, *Streptococcus* ou *Pseudomonas*, a leitura das diretrizes clínicas indica que em pacientes diagnosticados com pneumonia podem ser encontrados pelo menos 10^4 UFC por mL de lavado broncoalveolar. De acordo com os dados levantados por autores, é provável que 10^4 UFC liberem CPS suficiente para obter proteção contra CAMPs. Outra circunstância importante a ser considerado in vivo, é se haveria liberação de defensinas suficiente para estimular a liberação CPS da superfície bacteriana. Foi relatado que neutrófilos após sua ativação podem liberar pelo menos 1 µg/mL de HNP-1, indicando que in vivo haveria CAMP suficiente para liberar uma quantidade significativa de CPS (GANZ, 1987; LLOBET-BROSSA; TOMAS; BENGOCHEA, 2009).

Outros autores concluíram que as alfa-defensinas possuem efeito bactericida contra pneumococos em geral, contudo, a cápsula ao invés de proteger a bactéria se mostra mais susceptível, levando ao aumento de mortes por defensinas. Foi testado a atividade das defensinas na cepa *S. pneumoniae* TIGR4 encapsulada, o HNP 1-3 comercial com 3,75 µg/mL matou 90% do inóculo de TIGR4, enquanto a cepa TIGR4R não encapsulada foi menos sensível. O teste foi reproduzido e o resultado confirmado para outros sorotipos. Após comparar a taxa de morte, concluem que cepas de pneumococos que expressam polissacarídeos capsulares são mortas mais facilmente por HNP1-3 do que seus derivados não encapsulados (BEITER et al., 2008).

Outros autores concluem que a inibição da atividade antibacteriana pelas defensinas de neutrófilos humanos parece ser dependente da cepa (BEITER et al., 2008; ERICKSEN; WU; LU; LEHRER, 2005; TURNER et al., 1998), deste modo, avaliamos a contribuição de variações na cápsula polissacarídica neste mecanismo, comparando-se dois sorotipos capsulares diferentes, 2 e 4.

Já foi demonstrado que os HNPs opsonizam várias cepas bacterianas diferentes, o que pode levar ao aumento da fagocitose (FLEISCHMANN; SELSTED; LEHRER, 1985). Foi testado proteínas HNP1–3 recombinantes purificados de células polimorfonucleares (PMNs) humanos, resultados mostrar que estas proteínas foram capazes de aumentar a fagocitose de *S. aureus* por macrófagos humanos. Outros autores concluem que a atividade dos HNPs, pode ser relacionado a um efeito nos macrófagos e não nas bactérias. Resultados indicam que os HNPs fazem a ativação direta dos macrófagos e a rápida mobilização intracelular, sugerindo a ligação de HNPs a um receptor nos macrófagos. Ao atingir o local da infecção, os PMNs liberam HNP1–3 de seus grânulos primários, estes se acumulam no tecido e ativam macrófagos adjacentes (KHINE et al., 2006; SOEHNLEIN et al., 2008). Deste modo, podemos sugerir que para resultados in vitro algumas bactérias podem se mostrar mais resistentes ao efeito bactericida das proteínas bacterianas, indicando a necessidade de uma ação adjunta aos macrófagos para atingir os invasores.

A composição e os níveis de CAMPs podem mudar de indivíduo para indivíduo e entre diferentes locais dentro de hospedeiros humanos. Outros trabalhos evidenciaram que existe uma variação natural nos níveis de CAMPs em humanos e assim concluíram que níveis baixos de CAMPs estão associados ao aumento do risco de doenças infecciosas (BURTON; STEEL, 2009; RIVAS-SANTIAGO; SERRANO CARMEN; ENCISO-MORENO, 2009), se mostrando incapaz de proteger o organismo do invasor, assim indicando a razão de doses mais baixas de nosso estudo se mostrarem ineficazes em D39.

6. CONCLUSÃO

PspA protege a bactéria da ação de HNP-I, uma vez que mutantes negativos para a proteína são mais sensíveis ao AMP;

A adição de PspA recombinante ampliou o efeito protetor do pneumococo ao HNP-1.

A presença de anticorpos anti-PspA foi capaz de ampliar os efeitos líticos do HNP-1 sobre *S. pneumoniae*.

Mutantes não encapsulados derivados da cepa D39 (sorotipo 2), foram mais sensíveis a ação de HNP-I, enquanto TIGR4 apresentou sensibilidade semelhante à mutante sem cápsula

A cepa TIGR4 foi mais sensível à ação de HNP-I do que a cepa D39.

REFERÊNCIAS

ANDRE, G. O.; POLITANO, W. R.; MIRZA, S.; CONVERSO, T. R. Combined effects of lactoferrin and lysozyme on *Streptococcus pneumoniae* killing. **Microb Pathog**, 89, p. 7-17, Dec 2015.

ARNLIJOTS, K.; SØRENSEN, O.; LOLLIKE, K.; BORREGAARD, N. Timing, targeting and sorting of azurophil granule proteins in human myeloid cells. **Leukemia**, 12, n. 11, p. 1789-1795, 1998/11/01 1998.

ASSONI, L.; MILANI, B.; CARVALHO, M. R.; NEPOMUCENO, L. N. Resistance Mechanisms to Antimicrobial Peptides in Gram-Positive Bacteria. **Frontiers in microbiology**, 11, p. 593215-593215, 2020.

AUSTRIAN, R. Pneumococcus: The First One Hundred Years. **Reviews of Infectious Diseases**, 3, n. 2, p. 183-189, 1981a.

AUSTRIAN, R. Some Observations on the Pneumococcus and on the Current Status of Pneumococcal Disease and Its Prevention. **Reviews of Infectious Diseases**, 3, n. Supplement_1, p. S1-S17, 1981b.

BEITER, K.; WARTHA, F.; HURWITZ, R.; NORMARK, S. The Capsule Sensitizes *Streptococcus pneumoniae* to α -Defensins Human Neutrophil Proteins 1 to 3. **Infection and Immunity**, 76, n. 8, p. 3710-3716, 2008.

BEREZIN, E. N.; FALLEIROS-CARVALHO, L. H.; LOPES, C. R.; SANAJOTTA, A. T. [Pneumococcal meningitis in children: clinical findings, most frequent serotypes and outcome]. **J Pediatr (Rio J)**, 78, n. 1, p. 19-23, Jan-Feb 2002.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis**, 4, n. 3, p. 144-154, Mar 2004.

BORREGAARD, N.; SEHESTED, M.; NIELSEN, B. S.; SENDELØV, H. Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. **Blood**, 85, n. 3, p. 812-817, Feb 1 1995.

BOWDISH, D. M.; DAVIDSON, D. J.; HANCOCK, R. E. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. **Curr Top Microbiol Immunol**, 306, p. 27-66, 2006.

BUCK, C. B.; DAY, P. M.; THOMPSON, C. D.; LUBKOWSKI, J. Human α -defensins block papillomavirus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, n. 5, p. 1516, 2006.

BURTON, M. F.; STEEL, P. G. The chemistry and biology of LL-37. **Natural Product Reports**, 26, n. 12, p. 1572-1584, 2009. 10.1039/B912533G.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2018.

COBO, E. R.; CHADEE, K. Antimicrobial Human β -Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. **Pathogens**, 2, n. 1, 2013.

CONVERSO, T. R.; ASSONI, L.; ANDRE, G. O.; DARRIEUX, M. The long search for a serotype independent pneumococcal vaccine. **Expert Rev Vaccines**, 19, n. 1, p. 57-70, Jan 2020.

COWLAND, J. B.; BORREGAARD, N. The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. **J Leukoc Biol**, 66, n. 6, p. 989-995, Dec 1999.

CROSS, A. S. The biologic significance of bacterial encapsulation. **Curr Top Microbiol Immunol**, 150, p. 87-95, 1990.

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

DATHE, M.; WIEPRECHT, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. **Biochim Biophys Acta**, 1462, n. 1-2, p. 71-87, Dec 15 1999.

DIAMOND, G.; BEVINS, C. L. beta-Defensins: endogenous antibiotics of the innate host defense response. **Clin Immunol Immunopathol**, 88, n. 3, p. 221-225, Sep 1998.

DRIJKONINGEN, J. J.; ROHDE, G. G. Pneumococcal infection in adults: burden of disease. **Clin Microbiol Infect**, 20 Suppl 5, p. 45-51, May 2014.

EASTON, D. M.; NIJNIK, A.; MAYER, M. L.; HANCOCK, R. E. W. Potential of immunomodulatory host defense peptides as novel anti-infectives. **Trends in Biotechnology**, 27, n. 10, p. 582-590, 2009.

ENGHOLM, D. H.; KILIAN, M.; GOODSSELL, D. S.; ANDERSEN, E. S. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Microbiol Rev**, 41, n. 6, p. 854-879, Nov 1 2017.

ERICKSEN, B.; WU, Z.; LU, W.; LEHRER, R. I. Antibacterial activity and specificity of the six human {alpha}-defensins. **Antimicrob Agents Chemother**, 49, n. 1, p. 269-275, Jan 2005.

FLEISCHMANN, J.; SELSTED, M. E.; LEHRER, R. I. Opsonic activity of MCP-1 and MCP-2, cationic peptides from rabbit alveolar macrophages. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 3, n. 3, p. 233-242, May 1985.

GANZ, T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes. **Infect Immun**, 55, n. 3, p. 568-571, Mar 1987.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, 3, n. 9, p. 710-720, 2003/09/01 2003.

GANZ, T.; SELSTED, M. E.; SZKLAREK, D.; HARWIG, S. S.

GOULART, C.; DARRIEUX, M.; RODRIGUEZ, D.; PIMENTA, F. C. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**, 29, n. 8, p. 1634-1642, Feb 11 2011.

GRIGAT, J.; SORURI, A.; FORSSMANN, U.; RIGGERT, J. Chemoattraction of Macrophages, T Lymphocytes, and Mast Cells Is Evolutionarily Conserved within the Human α -Defensin Family. **The Journal of Immunology**, 179, n. 6, p. 3958, 2007.

HUANG, H. W. Action of antimicrobial peptides: two-state model. **Biochemistry**, 39, n. 29, p. 8347-8352, Jul 25 2000.

HUBERT, P.; HERMAN, L.; RONCARATI, P.; MAILLARD, C. Altered α -defensin 5 expression in cervical squamocolumnar junction: implication in the formation of a viral/tumour-permissive microenvironment. **The Journal of Pathology**, 234, n. 4, p. 464-477, 2014/12/01 2014. <https://doi.org/10.1002/path.4435>.

HÅKANSSON, A.; ROCHE, H.; MIRZA, S.; MCDANIEL, L. S. Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. **Infect Immun**, 69, n. 5, p. 3372-3381, May 2001.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. Peptide antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev**, 19, n. 3, p. 491-511, Jul 2006.

JENSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. Peptide Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 19, n. 3, p. 491-511, 2006.

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

JOINER, K. A.; GANZ, T.; ALBERT, J.; ROTROSEN, D. The opsonizing ligand on *Salmonella typhimurium* influences incorporation of specific, but not azurophil, granule constituents into neutrophil phagosomes. **J Cell Biol**, 109, n. 6 Pt 1, p. 2771-2782, Dec 1989.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, J. C.; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nat Rev Microbiol**, 6, n. 4, p. 288-301, Apr 2008.

KAGAN, B. L.; SELSTED, M. E.; GANZ, T.; LEHRER, R. I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 87, n. 1, p. 210-214, 1990.

KHINE, A. A.; DEL SORBO, L.; VASCHETTO, R.; VOGLIS, S. Human neutrophil peptides induce interleukin-8 production through the P2Y6 signaling pathway. **Blood**, 107, n. 7, p. 2936-2942, Apr 1 2006.

KIM, J. O.; WEISER, J. N. Association of Intrastrain Phase Variation in Quantity of Capsular Polysaccharide and Teichoic Acid with the Virulence of *Streptococcus pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases**, 177, n. 2, p. 368-377, 1998.

KLUGMAN, K. P. Contribution of vaccines to our understanding of pneumococcal disease. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, 366, n. 1579, p. 2790-2798, Oct 12 2011.

KOVÁCS, M.; HALFMANN, A.; FEDTKE, I.; HEINTZ, M. A Functional *dlt* Operon, Encoding Proteins Required for Incorporation of d-Alanine in Teichoic Acids in Gram-Positive Bacteria, Confers Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides in *Streptococcus pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, 188, n. 16, p. 5797-5805, 2006/08/15 2006.

LANE, J. R.; TATA, M.; BRILES, D. E.; ORIHUELA, C. J. A Jack of All Trades: The Role of Pneumococcal Surface Protein A in the Pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. **Front Cell Infect Microbiol**, 12, p. 826264, 2022.

LEHRER, R. I.; BARTON, A.; DAHER, K. A.; HARWIG, S. S. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity. **The Journal of clinical investigation**, 84, n. 2, p. 553-561, 1989.

LEHRER, R. I.; GANZ, T.; SELSTED, M. E. Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. **Cell**, 64, n. 2, p. 229-230, Jan 25 1991.

LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, 12, n. 5, p. 371-387, 2013/05/01 2013.

LEYENAAR, J. K.; RALSTON, S. L.; SHIEH, M. S.; PEKOW, P. S. Epidemiology of pediatric hospitalizations at general hospitals and freestanding children's hospitals in the United States. **J Hosp Med**, 11, n. 11, p. 743-749, Nov 2016.

LI, Y.; WEINBERGER DANIEL, M.; THOMPSON CLAUDETTE, M.; TRZCIŃSKI, K. Surface Charge of *Streptococcus pneumoniae* Predicts Serotype Distribution. **Infection and Immunity**, 81, n. 12, p. 4519-4524, 2013/12/01 2013.

LI, Y.; WEINBERGER, D. M.; THOMPSON, C. M.; TRZCIŃSKI, K. Surface Charge of *Streptococcus pneumoniae* Predicts Serotype Distribution. **Infection and Immunity**, 81, n. 12, p. 4519-4524, 2013.

LICHTENSTEIN, A. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. **J Clin Invest**, 88, n. 1, p. 93-100, Jul 1991.

LILLARD, J. W., JR.; BOYAKA, P. N.; CHERTOV, O.; OPPENHEIM, J. J.

LLOBET, E.; TOMÁS, J. M.; BENGOCHEA, J. A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. **Microbiology (Reading)**, 154, n. Pt 12, p. 3877-3886, Dec 2008.

LLOBET-BROSSA, E.; TOMAS, J.; BENGOCHEA, J. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. **Microbiology (Reading, England)**, 154, p. 3877-3886, 01/01 2009.

LOHNER, K.; LATAL, A.; LEHRER, R. I.; GANZ, T. Differential Scanning Microcalorimetry Indicates That Human Defensin, HNP-2, Interacts Specifically with Biomembrane Mimetic Systems. **Biochemistry**, 36, n. 6, p. 1525-1531, 1997/02/01 1997.

LÓPEZ, R. Pneumococcus: the sugar-coated bacteria. **Int Microbiol**, 9, n. 3, p. 179-190, Sep 2006.

MAJCHRZYKIEWICZ JOANNA, A.; KUIPERS OSCAR, P.; BIJLSMA JETTA, J. E. Generic and Specific Adaptive Responses of Streptococcus pneumoniae to Challenge with Three Distinct Antimicrobial Peptides, Bacitracin, LL-37, and Nisin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54, n. 1, p. 440-451, 2010/01/01 2010.

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

MASUDA, K.; MASUDA, R.; NISHI, J.; TOKUDA, K. Incidences of nasopharyngeal colonization of respiratory bacterial pathogens in Japanese children attending day-care centers. **Pediatr Int**, 44, n. 4, p. 376-380, Aug 2002.

MCCOOL, T. L.; CATE, T. R.; MOY, G.; WEISER, J. N. The immune response to pneumococcal proteins during experimental human carriage. **J Exp Med**, 195, n. 3, p. 359-365, Feb 4 2002.

MILANI, B. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INDOLICIDINA SOBRE Streptococcus pneumoniae SELVAGEM E MUTANTE PARA O GENE *pspA*. 2019.

MOROMIZATO, T.; LITONJUA, A. A.; BRAUN, A. B.; GIBBONS, F. K. Association of Low Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels and Sepsis in the Critically Ill. **Critical Care Medicine**, 42, n. 1, 2014.

NIYONSABA, F.; USHIO, H.; NAKANO, N.; NG, W. Antimicrobial Peptides Human β -Defensins Stimulate Epidermal Keratinocyte Migration, Proliferation and Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. **Journal of Investigative Dermatology**, 127, n. 3, p. 594-604, 2007.

NIZET, V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. **Curr Issues Mol Biol**, 8, n. 1, p. 11-26, Jan 2006.

O'NEILL, J. Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. London: Wellcome Trust: 80 pp. p. 2016.

OGUNNIYI, A. D.; GRABOWICZ, M.; BRILES, D. E.; COOK, J. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, 75, n. 1, p. 350-357, Jan 2007.

OLIVEIRA, G. S.; OLIVEIRA, M. L. S.; MIYAJI, E. N.; RODRIGUES, T. C. Pneumococcal Vaccines: Past Findings, Present Work, and Future Strategies. **Vaccines (Basel)**, 9, n. 11, Nov 17 2021.

OMARDIEN, S.; BRUL, S.; ZAAT, S. A. J. Antimicrobial Activity of Cationic Antimicrobial Peptides against Gram-Positives: Current Progress Made in Understanding the Mode of Action and the Response of Bacteria. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 4, n. 111, 2016-October-14 2016. Review.

OMS. Organização Mundial da Saúde. 2021.

OUELLETTE, A. J.; GRECO, R. M.; JAMES, M.; FREDERICK, D. Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. **J Cell Biol**, 108, n. 5, p. 1687-1695, May 1989.

PANYUTICH, A. V.; PANYUTICH, E. A.; KRAPIVIN, V. A.; BATUREVICH, E. A. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. **J Lab Clin Med**, 122, n. 2, p. 202-207, Aug 1993.

PESCHEL, A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? **Trends in Microbiology**, 10, n. 4, p. 179-186, 2002.

REHAUME, L. M.; HANCOCK, R. E. Neutrophil-derived defensins as modulators of innate immune function. **Crit Rev Immunol**, 28, n. 3, p. 185-200, 2008.

REN, B.; MCCRORY, M. A.; PASS, C.; BULLARD, D. C. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. **J Immunol**, 173, n. 12, p. 7506-7512, Dec 15 2004.

RIVAS-SANTIAGO, B.; SERRANO CARMEN, J.; ENCISO-MORENO, J. A. Susceptibility to Infectious Diseases Based on Antimicrobial Peptide Production. **Infection and Immunity**, 77, n. 11, p. 4690-4695, 2009/11/01 2009.

RIVAS-SANTIAGO, B.; SERRANO, C. J.; ENCISO-MORENO, J. A. Susceptibility to Infectious Diseases Based on Antimicrobial Peptide Production. **Infection and Immunity**, 77, n. 11, p. 4690-4695, 2009.

ROCHE, H.; HÅKANSSON, A.; HOLLINGSHEAD SUSAN, K.; BRILES DAVID, E. Regions of PspA/EF3296 Best Able To Elicit Protection against *Streptococcus pneumoniae* in a Murine Infection Model. **Infection and Immunity**, 71, n. 3, p. 1033-1041, 2003/03/01 2003.

SALZMAN, N. H.; GHOSH, D.; HUTTNER, K. M.; PATERSON, Y. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. **Nature**, 422, n. 6931, p. 522-526, Apr 3 2003.

SCHMIDT-IOANAS, M.; LODE, H. Treatment of pneumonia in elderly patients. **Expert Opin Pharmacother**, 7, n. 5, p. 499-507, Apr 2006.

SENKOVICH, O.; COOK, W. J.; MIRZA, S.; HOLLINGSHEAD, S. K. Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein a provides insight into microbial defense mechanism. **J Mol Biol**, 370, n. 4, p. 701-713, Jul 20 2007.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 1462, n. 1, p. 55-70, 1999/12/15/ 1999.

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**, 72, n. 9, p. 5031-5040, Sep 2004.

SIMELL, B.; AURANEN, K.; KÄYHTY, H.; GOLDBLATT, D. The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. **Expert Rev Vaccines**, 11, n. 7, p. 841-855, Jul 2012.

SOEHNLEIN, O.; KAI-LARSEN, Y.; FRITHIOF, R.; SORENSEN, O. E.

SOEHNLEIN, O.; KAI-LARSEN, Y.; FRITHIOF, R.; SORENSEN, O. E. Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. **J Clin Invest**, 118, n. 10, p. 3491-3502, Oct 2008.

STRAUS, D. C.; ATKISSON, D. L.; GARNER, C. W. Importance of a lipopolysaccharide-containing extracellular toxic complex in infections produced by *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Immun**, 50, n. 3, p. 787-795, Dec 1985.

SUAREZ-CARMONA, M.; HUBERT, P.; DELVENNE, P.; HERFS, M. Defensins: "Simple" antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 26, n. 3, p. 361-370, 2015/06/01/ 2015.

SWIATLO, E.; CHAMPLIN FRANKLIN, R.; HOLMAN STEVEN, C.; WILSON, W. W. Contribution of Choline-Binding Proteins to Cell Surface Properties of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, 70, n. 1, p. 412-415, 2002/01/01 2002.

SÁNCHEZ-GÓMEZ, S.; LAMATA, M.; LEIVA, J.; BLONDELLE, S. E. Comparative analysis of selected methods for the assessment of antimicrobial and membrane-permeabilizing activity: a case study for lactoferricin derived peptides. **BMC Microbiology**, 8, n. 1, p. 196, 2008/11/11 2008.

SØRENSEN, O.; ARNLJOTS, K.; COWLAND, J. B.; BAINTON, D. F. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. **Blood**, 90, n. 7, p. 2796-2803, Oct 1 1997.

TAI, S. S. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. **Crit Rev Microbiol**, 32, n. 3, p. 139-153, 2006.

TURNER, J.; CHO, Y.; DINH, N. N.; WARING, A. J. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. **Antimicrob Agents Chemother**, 42, n. 9, p. 2206-2214, Sep 1998.

VADESILHO CINTIA, F. M.; FERREIRA DANIELA, M.; GORDON STEPHEN, B.; BRILES DAVID, E. Mapping of Epitopes Recognized by Antibodies Induced by Immunization of Mice with PspA and PspC. **Clinical and Vaccine Immunology**, 21, n. 7, p. 940-948, 2014/07/01 2014.

VALORE, E. V.; MARTIN, E.; HARWIG, S. S.; GANZ, T. Intramolecular inhibition of human defensin HNP-1 by its piece. **The Journal of Clinical Investigation**, 97, n. 7, p. 1624-1629, 04/01/ 1996.

VOLLMER, W.; BERTSCHE, U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. **Biochim Biophys Acta**, 1778, n. 9, p. 1714-1734, Sep 2008.

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

WARTHA, F.; BEITER, K.; ALBIGER, B.; FERNEBRO, J. Capsule and d-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. **Cellular Microbiology**, 9, n. 5, p. 1162-1171, 2007/05/01 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00857.x>.

WAZ, N. Influence of the Polysaccharide Capsule on the Bactericidal Activity of Indolicidin on *Streptococcus pneumoniae*. 2022.

WHITE, S. H.; WIMLEY, W. C.; SELSTED, M. E. Structure, function, and membrane integration of defensins. **Curr Opin Struct Biol**, 5, n. 4, p. 521-527, Aug 1995.

YEAMAN, M. R.; BAYER, A. S.; KOO, S. P.; FOSS, W. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. **J Clin Invest**, 101, n. 1, p. 178-187, Jan 1 1998.

YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. **Pharmacological Reviews**, 55, n. 1, p. 27, 2003.

YIN, L. M.; EDWARDS, M. A.; LI, J.; YIP, C. M. Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions ^{*}. **Journal of Biological Chemistry**, 287, n. 10, p. 7738-7745, 2012.

YUN, K. W.; WALLIHAN, R.; DESAI, A.; ALTER, S. Clinical Characteristics and Etiology of Community-Acquired Pneumonia in US Children, 2015-2018. **Pediatr Infect Dis J**, Feb 8 2022.

ANEXOS**Anexo I: Aprovação da CEUA**



Bragança Paulista, 29 de Agosto de 2019

Projeto de Pesquisa: "Avaliação da produção de anticorpos em camundongos imunizados com proteínas de pneumococo produzidas de forma recombinante".

Área de Conhecimento: Imunologia Aplicada – 2.11.04.00-0

Autor: Profa. Michelle Darrieux Sampaio Bertocini

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo **Versão 2**: 001.06.2019

IP. Ciuca: 200.225.122.34

CIAEP/CONCEA N° 01.226.2014

Vigência do Projeto: 01/09/2019 – 20/12/2020

Número e Animais: 60 animais

Espécie: camundongos isogênicos

Peso: 20gr

Linhagem: BALB/c

Total de Animais: 60 camundongos fêmeas

Procedência do Animal: Biotério/CEMIB - UNICAMP

Prezado Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa – CEUA, da Universidade São Francisco analisou em reunião no dia 29/08/2019, o projeto de pesquisa, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

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

Parecer: **Aprovado**

Em resposta à solicitação de projeto de pesquisa utilizados no protocolo 002.06.2019, o Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa (CEUA) da USF foi avaliado pelos membros do CEUA e considerado APROVADO.

Profa. Thalita Rocha
Coordenadora do Comitê de Ética com
Uso de Animais de Experimentação
Universidade São Francisco



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da produção de anticorpos em camundongos imunizados com proteínas de pneumococo produzidas de forma recombinante". protocolo nº 001.06.2019 sob responsabilidade da pesquisadora Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional e Controle a Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética o Uso de Animais (CEUA da Universidade São Francisco – USF), em reunião do dia 29/08/2019.

Protocolo Versão 2: 002.06.2019

IP. Ciuca: 200.225.122.34

CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014

Protocolo **Versão 2**: 001.06.2019

Vigência do Projeto: 01/09/2019 – 20/12/2020

Número e Animais: 60 animais

Espécie: camundongos isogênicos

Peso: 20gr

Linhagem: BALB/c

Total de Animais: 60 camundongos fêmeas

Procedência do Animal: Biotério/CEMIB – UNICAMP

Procedência do Animal: Laboratório – ANILAB – Animais de Laboratório Criação e Comércio, Laboratórios Veterinários.

Prof. Thalita Rocha

Coordenadora do Comitê de Ética com
Uso de Animais de Experimentação
Universidade São Francisco