

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

SHEILA CAMARGO DE OLIVEIRA

AÇÃO DA CATELICIDINA LL-37 SOBRE *Streptococcus pneumoniae*: PAPEL DA PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO A (PspA) E DA CÁPSULA POLISSACARÍDICA

Bragança Paulista
2023

SHEILA CAMARGO DE OLIVEIRA – R.A: 202220921

AÇÃO DA CATELICIDINA LL-37 SOBRE *Streptococcus pneumoniae*: PAPEL DA PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO A (PspA) E DA CÁPSULA POLISSACARÍDICA

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

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Thiago Rojas Converso

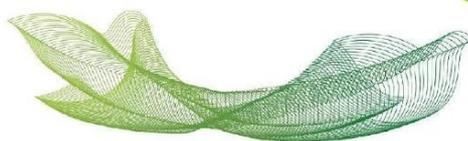
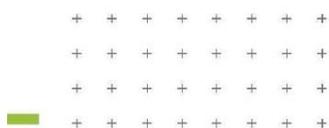
Bragança Paulista
2023

WC 217 Oliveira, Sheila Camargo de.
O51a Ação da catelicidina LL-37 sobre *streptococcus pneumoniae*: papel da proteína de superfície de pneumococo a (PspA) e da cápsula polissacarídica / Sheila Camargo de Oliveira. – Bragança Paulista, 2023.
46 p.

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

Orientação de: Thiago Rojas Converso.

1. Cápsula polissacarídica. 2. LL-37. 3. PspA.
4. *Streptococcus pneumoniae*. I. Converso, Thiago Rojas. II. Título.



Educando
para a paz

OLIVEIRA, Sheila Camargo de. "Ação da catelicidina LI-37 sobre *Streptococcus Pneumoniae*: Papel da proteína de superfície de pneumococo A (PspA) e da cápsula polissacarídica". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 5 de dezembro de 2023 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Thiago Rojas Converso - Orientador e Presidente
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Giovana Cappio Barozzone
(por videoconferência)
Instituto Butantan

Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani
Universidade São Francisco

AGRADECIMENTOS

A mim, por nunca ter desistido, mesmo nos momentos mais difíceis.

À Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini, não consigo expressar o quão importante a sua presença na minha trajetória científica e acadêmica significa, mas saiba que este trabalho e todos os que virão através de mim no futuro, existirão porque a senhora sempre esteve presente e disposta a me ajudar e me incentivar. Muito obrigada.

Ao Professor Dr. Thiago Converso, por sempre estar disposto a me ajudar e ensinar da melhor maneira possível.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, conhecer todos vocês, poder compartilhar as dores, alegrias e conhecimento foram essenciais para que eu chegasse ao fim dessa caminhada.

À minha amiga Natalha Tedeschi, que me mostrou como essa jornada era e poderia ser, sendo minha parceira em todos os momentos.

Ao Douglas, meu companheiro e maior incentivador. O caminho até aqui foi mais leve e feliz com você.

A todos os professores do Programa *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, conhecê-los foi primordial para a minha formação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa ao qual este trabalho esteve vinculado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.666343./2022-00

EPÍGRAFE

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.

Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa.

Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva, causa líder de infecções do trato respiratório, especialmente pneumonia, com significativa morbidade e mortalidade mundialmente. Entre os fatores de virulência do pneumococo, estão a cápsula polissacarídica (CPS), responsável pela proteção contra fagocitose, e a Proteína de superfície de pneumococo A (PspA) – uma proteína exposta capaz de interagir com diferentes moléculas da imunidade inata. Estudos do nosso grupo mostraram que PspA é capaz de inibir a ação bactericida da lactoferrina e indolicidina – dois peptídeos antimicrobianos (AMPs). Os AMPs participam do sistema imune inato, promovendo a morte bacteriana principalmente via interações de membrana. Outro AMP catiônico com ação similar é o LL-37, uma catelicidina com efeitos bactericidas contra vários patógenos. Pneumococos apresentam resistência variada ao LL-37; porém, o papel da PspA e da cápsula na ação bactericida de LL-37 não foi caracterizado. O presente trabalho busca investigar as contribuições da PspA e da CPS para a ação lítica de LL-37 sobre o *Streptococcus pneumoniae*. Um ensaio bactericida *in vitro* foi projetado para avaliar a resistência de pneumococos ao LL-37, comparando-se cepas do tipo selvagem e mutantes que não produzem PspA ou cápsula. Efeitos da PspA e da CPS na ação lítica do LL-37 foram investigados utilizando fragmentos de PspA recombinante, polissacarídeos purificados e anticorpos anti-PspA e anticápsula. Pneumococos mutantes para o gene PspA foram mais sensíveis à ação de LL-37 do que a cepa selvagem. A adição de rPspA resgatou a bactéria dos efeitos do AMP, enquanto a opsonização com anticorpos anti-PspA favoreceu a ação de LL-37, causando a morte da bactéria. Os efeitos da CPS sobre a ação de LL-37 foram dependentes do sorotipo capsular; para bactérias de sorotipo 2, a ausência de cápsula favoreceu a ação bactericida de LL-37, enquanto a cápsula de tipo 4 teve menor impacto na ação do AMP. Os resultados do presente estudo indicam que PspA protege pneumococos da ação de LL-37, enquanto os efeitos da cápsula são dependentes do sorotipo. Estes dados fornecem um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra o pneumococo. Além disso, a capacidade dos anticorpos induzidos pela vacinação de interferir com LL-37 irá corroborar o desenvolvimento de estratégias futuras para profilaxia de doenças pneumocócicas.

Palavras-chave: Cápsula externa. Catelicidinas. Proteínas de membrana. *Streptococcus pneumoniae*.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive bacterium, the leading cause of respiratory tract infections, especially pneumonia, with significant morbidity and mortality worldwide. Among the virulence factors of pneumococcus are the polysaccharide capsule (CPS), responsible for protection against phagocytosis, and pneumococcal surface protein A (PspA) – an exposed protein capable of interacting with different receptors of innate immunity. Studies from our group shown that PspA is capable of inhibiting the bactericidal action of lactoferrin and indolicidin – two antimicrobial peptides (AMPs). AMPs participate in the innate immune system, promoting bacterial death mainly via membrane interactions. Another cationic AMP with similar action is LL-37, a cathelicidin with bactericidal effects against various pathogens. Pneumococci showed varying resistance to LL-37; however, the role of PspA and the capsule in the bactericidal action of LL-37 has not been characterized. The present work seeks to investigate the contributions of PspA and CPS to the lytic action of LL-37 on *Streptococcus pneumoniae*. An *in vitro* bactericidal assay was designed to assess the resistance of pneumococci to LL-37, comparing wild-type and mutant strains that did not produce PspA or capsule. The effects of PspA and CPS on the lytic action of LL-37 were investigated using recombinant PspA fragments, purified polysaccharides, and anti-PspA and anti-capsule antibodies. Mutant pneumococci for the PspA gene were more sensitive to the action of LL-37 than the wild-type strain. The addition of rPspA rescued the bacteria from the effects of AMP, while the opsonization with an anti-PspA antibodies favored the action of LL-37, causing the death of the bacteria. The effects of CPS on LL-37 action were dependent on the capsular serotype; for serotype 2 bacteria, the absence of a capsule favored the bactericidal action of LL-37, while a type 4 capsule had a lesser impact on the action of AMP. The results of the present study indicate that PspA protects pneumococci from the action of LL-37, while the capsule's effects depend on the serotype. These data provide an essential host defense mechanism against pneumococcus. Furthermore, the ability of vaccine-induced interference with LL-37 will support the development of future strategies for the prevention of pneumococcal disease.

Keywords: *External Capsule. Cathelicidins. Membrane Proteins. Streptococcus pneumoniae.*