

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

REBECA DA SILVA FARIA

**RESISTÊNCIA DE *Streptococcus pneumoniae* À DEFENSINA
HUMANA HNP-I: CONTRIBUIÇÕES DA CÁPSULA
POLISSACARÍDICA E DA PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE A
(PspA)**

Bragança Paulista
2025

REBECA DA SILVA FARIA – R.A. 202349622

**RESISTÊNCIA DE *Streptococcus pneumoniae* À DEFENSINA
HUMANA HNP-I: CONTRIBUIÇÕES DA CÁPSULA
POLISSACARÍDICA E DA PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE A
(PspA)**

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: Ciências da Saúde

Orientador: Profa Michelle Darrieux

Bragança Paulista
2025

WC 217
F236r

Faria, Rebeca da Silva

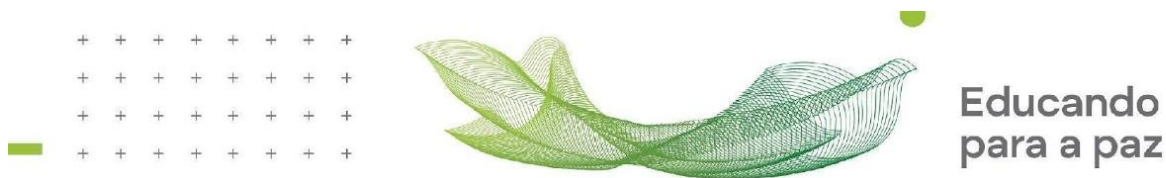
Resistência de *streptococcus pneumoniae* à defensina humana HNP-I: contribuições da cápsula polissacarídica e da proteína de superfície A (PspA) / Rebeca da Silva Faria. -- Bragança Paulista, 2025.
80 p.

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. HNP. 3. PspA. 4. Alfa-Defensinas. 5. Cápsula. I. Darrieux, Michelle. II. Título.

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – SIBUSF Ficha catalográfica elaborada por: Isadora Ramalho Pelosi - CRB-8/11448



FARIA, Rebeca da Silva. "Resistência de *Streptococcus Pneumoniae* à defensina humana HNP-1: contribuições da cápsula polissacarídica e da proteína de superfície A (PspA)". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 05 de dezembro de 2025 pela Banca examinadora constituída pelos(as) professores(as):

Prof(a). Dr(a). Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini
Orientador(a) e Presidente
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Monalisa Martins Trentini
(por videoconferência)
Instituto Butantan

Prof(a). Dr(a). Lúcio Fábio Caldas Ferraz
Universidade São Francisco

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me sustentado até aqui e me guiado nas adversidades.

À minha mãe, Elaine Cristina, pelo amor incondicional, pelo apoio constante e por jamais permitir que eu desistisse, sempre me lembrando do meu valor e do meu potencial.

Ao meu noivo, Mateus, por todo cuidado, paciência e por ser meu porto seguro ao longo desta trajetória.

À minha rede de apoio — familiares e amigos — que, com carinho e torcida constante, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora, Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini, pela paciência, dedicação e ensinamentos, ter seu suporte foi fundamental para o meu crescimento científico.

Aos Profs. Drs. Raquel Girardello, Thaís Parisotto, Thiago Converso e Lucio Ferraz por toda colaboração e ajuda.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos, em especial a Maria Eduarda Pereira Mendes, pela contribuição e por ter sido meu braço direito durante os experimentos.

À minha amiga, também mestranda, Thalita Bastos de Freitas e Silva, pela convivência, pelo apoio e troca de experiências. Foi um presente ter te conhecido durante essa jornada.

A todos os professores do Programa *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, que foram os pilares da minha formação, levarei os aprimoramentos para a vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.995561/2024-00.

Declaro que esta dissertação é resultado de trabalho original de minha autoria. Ferramentas de inteligência artificial (por exemplo, ChatGPT, OpenAI) foram utilizadas apenas para apoio linguístico e revisão gramatical, sob supervisão e edição integral do autor. Não houve uso dessas ferramentas para elaboração de conteúdos científicos, conceituais ou analíticos que caracterizem contribuição intelectual substancial.

Ser gentil com você mesmo é uma das maiores gentilezas."
Charlie Mackesy, em O Menino, a Toupeira, a Raposa e o
Cavalo

RESUMO

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é um patógeno de grande interesse clínico, responsável por elevada mortalidade no mundo todo. Causa doenças de gravidade variável, resultando em quadros locais como otite média e conjuntivite, até em formas mais graves como pneumonia, meningite e sepse. Afeta principalmente crianças, idosos e indivíduos imunossuprimidos. A cápsula polissacarídica (CPS) e proteínas de superfície A de pneumococo (PspA) são importantes fatores de virulência, atuando na proteção contra a fagocitose e interação com proteínas do sistema complemento e peptídeos antimicrobianos (AMP) sobre a bactéria. Um importante AMP humano é HNP-I, uma alfa-defensina de neutrófilos que apresenta ação antimicrobiana e imunomoduladora. Sabe-se que o pneumococo é parcialmente resistente à ação das alfa-defensinas, no entanto, os mecanismos responsáveis pela resistência a esta família de AMPs não estão completamente esclarecidos. O presente trabalho avaliou o efeito do tratamento com HNP-I sobre diferentes sorotipos de pneumococo mutantes para PspA e/ou cápsula. As concentrações inibitórias de HNP-I sobre o pneumococo foram determinadas utilizando-se um ensaio bactericida *in vitro*. Pneumococos de diferentes sorotipos capsulares e seus mutantes isogênicos para PspA e cápsula foram avaliados quanto à resistência ao tratamento com o AMP. Os efeitos protetores da proteína PspA também foram avaliados pela adição de proteína recombinante ou de anticorpos anti-PspA previamente ao tratamento com o AMP. Os ensaios demonstraram que a ausência da proteína de superfície PspA nas cepas mutantes aumentou significativamente a susceptibilidade do pneumococo ao peptídeo, comparado as cepas selvagens, enquanto a adição de rPspA aumentou a sobrevivência da bactéria e promoveu efeito protetor. A presença de anticorpos anti-PspA potencializou a ação antimicrobiana da defensina, sugerindo que a combinação de mecanismos amplia a eficácia da resposta imune. A cápsula também influenciou resistência, no entanto esse efeito se mostrou sorotipo dependente. Os dados deste trabalho contribuíram com a elucidação do papel de dois fatores de virulência bacterianos – PspA e cápsula – na ação das defensinas sobre o pneumococo – um importante mecanismo de defesa que pode ser explorado para criação de possíveis novos tratamentos.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. HNP. Alfa-Defensinas. PspA. Cápsula.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) is a pathogen of major clinical interest, responsible for high mortality worldwide. It causes diseases of varying severity, ranging from localized infections such as otitis media and conjunctivitis to more severe conditions such as pneumonia, meningitis, and sepsis. It primarily affects children, the elderly, and immunocompromised individuals. The polysaccharide capsule (CPS) and pneumococcal surface protein A (PspA) are important virulence factors, acting in protection against phagocytosis and in interactions with complement system proteins and antimicrobial peptides (AMPs) on the bacterium. An important human AMP is HNP-I, a neutrophil α -defensin with antimicrobial and immunomodulatory activity. Pneumococcus is known to be partially resistant to α -defensins; however, the mechanisms underlying resistance to this family of AMPs are not fully understood. The present study evaluated the effect of HNP-I treatment on different pneumococcal serotypes with mutations in PspA and/or capsule. The inhibitory concentrations of HNP against pneumococcus were determined using an in vitro bactericidal assay. Pneumococci of different capsular serotypes and their isogenic mutants for PspA and capsule were assessed for resistance to AMP treatment. The protective effects of PspA protein were also evaluated through the addition of recombinant protein or anti-PspA antibodies prior to AMP exposure. The assays demonstrated that the absence of surface protein PspA in mutant strains significantly increased pneumococcal susceptibility to the peptide compared with wild-type strains, while the addition of rPspA enhanced bacterial survival and conferred a protective effect. The presence of anti-PspA antibodies potentiated the antimicrobial activity of the defensin, suggesting that the combination of mechanisms enhances immune response effectiveness. The capsule also influenced resistance; however, this effect was shown to be serotype-dependent. The findings of this study contribute to elucidating the role of two key bacterial virulence factors – PspA and capsule – in the action of defensins against pneumococcus, highlighting an important defense mechanism that could be explored for the development of potential new treatments.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*. HNP-I. PspA. Alpha-defensins. Capsule.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ALF	em inglês “ <i>apolactoferrin</i> ” – <i>Apolactoferrina</i>
AMPs	Peptídeos antimicrobianos
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	em inglês “ <i>Bovine Serum Albumin</i> ”
cAMPs	Peptídeos antimicrobianos catiónicos
CBD	em inglês “choline-binding domain” – Domínio de ligação à colina
CbpA	em inglês “ <i>Choline-binding protein A</i> ” = PspC
CbpD	em inglês “ <i>choline-binding protein D</i> ” – Proteínas de ligação à colina D
CbpE	em inglês “ <i>choline-binding protein E</i> ” – Proteínas de ligação à colina E
CFR	em inglês “ <i>Case fatality rate</i> ” – taxa de letalidade
CPS	em inglês “ <i>Capsular Polysaccharide</i> ” (cápsula polissacarídica)
CRP	em inglês “ <i>C-reactive protein</i> ” – Proteína C-reativa
CR3	em inglês “ <i>complement receptor 3</i> ” – Receptor de complemento 3
C3 / C3b	em inglês “ <i>complement component C3 / C3b</i> ” – Componentes do sistema complemento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.600 nm	Densidade Óptica = 600nm
<i>erm(B)</i>	em inglês “ <i>erythromycin ribosome methylase</i> ” – gene de resistência a antibióticos
GAPDH	Proteínas de ligação ao plasminogênio – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HDs	Defensinas humanas
HNP	Peptídeo de neutrófilo humano

kDa	em inglês “ <i>kilodalton</i> ” – Quilodalton
LFN	em inglês “ <i>lactoferricin</i> ” – Lactoferricina
LTA	em inglês “ <i>lipoteichoic acid</i> ” – Ácido lipoteicóico
LytA	Autolisina pneumocócica
LZ	em inglês “ <i>lysozyme</i> ” – Lisozima
<i>mef(A/E)</i>	em inglês “ <i>macrolide efflux</i> ” – gene de resistência a antibióticos
Mg/mL	Miligrama por mililitro
Mm	Milimolar
PAC	Pneumonia adquirida na sociedade
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilina
PC	em inglês “ <i>phosphorylcholine</i> ” – Fosforilcolina
PspA	em inglês “ <i>pneumococcal surface protein A</i> ” – Proteína de superfície pneumocócica A
PCV	Vacina pneumocócica conjugada
PCV10	Vacina pneumocócica conjugada 10-valente
PCV13	Vacina pneumocócica conjugada 13-valente
PGK	Proteínas de ligação ao plasminogênio – fosfoglicerato quinase
PH	Potencial hidrogeniônico
PhoP/PhoQ	em inglês “ <i>two-component regulatory system</i> ” – Sistema regulador de dois componentes
PlgR	em inglês “Polymeric immunoglobulin receptor” – Receptor poli-imunoglobulina
PNSP	Pneumococo não sensível à penicilina
PPV23	Vacina pneumocócica polissacarídica 23-valente
PRD	em inglês “ <i>proline-rich domain</i> ” – Região rica em prolina

PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PS	Polissacarídeos capsulares
PsaA	Adesina Pneumocócica A
PspA	Proteína de superfície A do pneumococo
PspC	Proteína de superfície C do pneumococo ou CbpA
rPspA	Proteína PspA recombinante
RrgA / RrgB / RrgC	em inglês “ <i>pili subunits</i> ” – Subunidades de fimbrias
SUS	Sistema Único de Saúde
THY	Meio Todd Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura
Tuf	Proteínas de ligação ao plasminogênio – fator de elongação Tu
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
WTA	em inglês “ <i>wall teichoic acid</i> ” – Ácido teicóico de parede
µg	Microgramas
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
αHD	em inglês “ <i>alpha-helical domain</i> ” – Domínio α-helicoidal

LISTA DE FIGURAS E FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura da PspA _____	20
FIGURA 2. Mecanismos de evasão do Sistema imune por <i>Streptococcus pneumoniae</i> _____	23
FIGURA 3. Principais classes estruturais de AMPs _____	27
FIGURA 4. Mecanismos moleculares de resistência bacteriana aos cAMPs _____	33
FIGURA 5. Cultivo bacteriano _____	44
FIGURA 6. Esquema do preprado do cultura bacteriana _____	45
FIGURA 7. Esquema ilustrativo do preparo das amostras bacterianas para o ensaio _____	46
FIGURA 8. Esquema experimental da incubação do pneumococo _____	47
FIGURA 9. Representação esquemática da diluição em série _____	48
FIGURA 10. Esquema do plaqueamento das amostras _____	49
FIGURA 11. Comparação de cepas encapsuladas de diferentes sorotipos: TIGR4 e D39 _____	52
FIGURA 12. Efeito da ausência de cápsula na redução de UFCs: TIGR4 e HR1001 _____	53
FIGURA 13. Efeito da ausência de cápsula na redução de UFCs: D39 e AM1000 _____	55
FIGURA 14. Efeito da ausência de PspA na redução de UFCs: TIGR4 e BR61.1 _____	56
FIGURA 15. Efeito da ausência de PspA na redução de UFCs: D39 e JY53 _____	57
FIGURA 10. Comparação de cepas encapsuladas de diferentes sorotipos: TIGR4 e D39 _____	51
FIGURA 16. Efeito da adição de PspA recombinante _____	59
FIGURA 17. Efeito da adição de anticorpos anti-PspA _____	60

LISTA DE TABELA

TABELA 1. Cepas de <i>Streptococcus pneumoniae</i> utilizados	43
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> : características e virulência	15
1.2. Peptídeos antimicrobianos e sua ação sobre o pneumococo	26
1.3. Resistência bacteriana aos peptídeos antimicrobianos	31
1.4. Justificativa	37
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Preparo do HNP-I	42
3.2. Isolados bacterianos	42
3.3. Ensaio bactericida	45
3.4. Efeito da adição de rPspA	49
3.5. Efeito da adição de anticorpos anti-PspA	50
3.6. Análise estatística	51
4. RESULTADOS	52
4.1. Efeito da cápsula sobre a ação bactericida do HNP-I sobre pneumococo	52
4.2. Efeito da proteína PspA na ação bactericida do HNP-I sobre pneumococo	55
4.3. Efeito da adição de rPspA na ação de HNP sobre o pneumococo	58
4.4. Efeito da adição de anticorpos anti-PspA na ação de HNP-I	59
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	79
Anexo 1	79
Anexo 2	80

1. INTRODUÇÃO

A interação entre os mecanismos de defesa do organismo humano e agentes infecciosos é fundamental para a compreensão das doenças e da resposta imunológica. Ao longo do tempo, essa relação evoluiu para uma adaptação mútua altamente dinâmica: os patógenos desenvolvem estratégias de invasão e resistência, e o hospedeiro melhora suas redes de reconhecimento e defesa. Compreender esse processo é essencial para o avanço do conhecimento em microbiologia, imunologia e saúde pública.

Entre os microrganismos que se destacam nas infecções respiratórias, o *Streptococcus pneumoniae* ocupa lugar de destaque. Altamente adaptável, este patógeno é responsável por um amplo espectro de doenças, que variam desde quadros leves, como sinusites, até manifestações graves, como pneumonias, meningites e bacteremias. Acomete principalmente indivíduos imunossuprimidos, idosos e crianças, estando diretamente associado a elevadas taxas de morbimortalidade, mesmo em contextos com acesso a tratamento médico e vacinação (BROOKS; MIAS, 2018). A complexidade da ação do pneumococo se deve, em grande parte, aos seus mecanismos de virulência, entre os quais se destacam a cápsula polissacarídica e a proteína de superfície PspA, ambos fundamentais para sua capacidade de evasão do sistema imune (BRILES et al., 2019).

A resistência antimicrobiana do *Streptococcus pneumoniae* tem aumentado de forma significativa e em escala global, especialmente em relação aos antibióticos β -lactâmicos e macrolídeos. Estima-se que cerca de 40% das cepas apresentem fenótipos multirresistentes, embora essa prevalência varie entre diferentes regiões e países (ANDREJKO et al., 2021). Além dos fatores genéticos, mudanças no perfil epidemiológico do *Streptococcus pneumoniae* refletem um aumento preocupante na gravidade dos quadros clínicos associados ao patógeno, especialmente em razão de sorotipos não cobertos pelas vacinas atualmente disponíveis, além do uso indiscriminado de antibióticos, que contribuem significativamente para a seleção de cepas resistentes, agravando o desafio do controle das infecções pneumocócicas.

Nos últimos anos, diversos estudos ampliaram o entendimento sobre a complexidade dos mecanismos de virulência do pneumococo, em especial, como a cápsula polissacarídica e a PspA contribuem para a evasão imunológica e para a patogenicidade do pneumococo. Apesar desse avanço, ainda permanecem dúvidas relevantes sobre como alterações estruturais específicas podem

modificar a resposta a componentes da imunidade inata, especialmente em relação à ação da alfa-defensina humana HNP-I.

Entender como diferentes variantes bacterianas respondem aos AMPs é importante tanto para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas quanto para ampliar o entendimento sobre os processos envolvidos na patogênese das infecções. A literatura já sinaliza que a ausência de cápsula ou de proteínas como a PspA pode alterar a sensibilidade dos pneumococos a agentes antimicrobianos (WAZ et al., 2022). No entanto, os efeitos dessa ausência sobre a ação específica da alfa-defensina humana ainda exigem uma exploração mais sistemática e experimental, o que pode contribuir significativamente para o avanço das estratégias antimicrobianas baseadas em peptídeos naturais e para uma compreensão mais refinada dos mecanismos de evasão bacteriana.

1.1. *Streptococcus pneumoniae*: características e virulência

Streptococcus pneumoniae, também conhecido como pneumococo, é uma bactéria Gram-positiva com morfologia de diplococo, anaeróbia facultativa e encapsulada, pertencente a família Streptococcaceae (TOIT et al., 2014). Ele é naturalmente encontrado como comensal na mucosa do trato respiratório superior, especialmente em crianças, mas pode tornar-se um patógeno invasivo e desencadear uma série de infecções respiratórias, otites médias, sinusites, meningites e bacteremias, principalmente em crianças, indivíduos imunocomprometidos e idosos (BROOKS; MIAS, 2018; LOUGHRAN; ORIHUELA; TUOMANEN, 2019).

O pneumococo é o responsável por cerca de 1.190.000 mortes anuais em nível global, predominantemente entre indivíduos com idade superior a 70 anos (FELDMAN; ANDERSON, 2020). No cenário brasileiro, dados do Ministério da Saúde indicam que o Sistema Único de Saúde (SUS) registra anualmente mais de 600 mil internações por pneumonia adquirida na comunidade (PAC). Somente entre janeiro e agosto de 2022, estima-se que ocorreram cerca de 418.000 internações causadas por PAC e influenza, das quais 44.523 levaram à morte, sendo o pneumococo o principal agente etiológico responsável por essas internações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

A transição do comportamento comensal para patogênico do pneumoco é mediada por um conjunto complexo de fatores de virulência, que conferem à bactéria a capacidade de aderir ao epitélio respiratório, evadir o sistema imune, invadir tecidos, multiplicar-se em ambientes adversos, e pode ocorrer principalmente quando associado a co-infecções. A composição genética e estrutural

do pneumococo permite rápida adaptação ao hospedeiro, sendo esta um dos pilares de sua virulência (BRILES et al., 2019).

O envoltório celular do pneumococo é composto por três estruturas fundamentais: a membrana plasmática, a parede celular e a cápsula. A membrana plasmática é formada por uma bicamada lipídica que delimita o citoplasma bacteriano. Externamente a ela, encontra-se a parede celular, cuja composição inclui peptidoglicanos, ácido teicóico e lipoteicóico, conferindo rigidez estrutural e proteção contra agentes externos. Na porção mais externa da célula, localiza-se a cápsula, constituída por polissacarídeos, que possui ampla variabilidade quanto à espessura e à composição química. Essa estrutura desempenha papel essencial na virulência do patógeno, contribuindo para a fuga do sistema imune do hospedeiro.

A cápsula polissacarídica é, sem dúvida, o principal fator de virulência do *S. pneumoniae*. Trata-se de uma estrutura espessa e mucoide que reveste a parede celular e impede a fagocitose pelos macrófagos, funcionando como uma barreira física contra a imunidade inata (MITCHELL; MITCHELL, 2010). Existem descritos até o momento mais de 100 sorotipos capsulares conhecidos, cada um com composição bioquímica específica, o que contribui para a diversidade antigênica do patógeno e para a dificuldade em estabelecer uma resposta imunológica universal (ABDUL RAHMAN et al., 2023; BRISSAC et al., 2021; GANAIE et al., 2020).

Essa variedade capsular é especialmente relevante quando se trata de infecções invasivas, pois os sorotipos diferem em capacidade de disseminação, expressão de outros fatores de virulência e suscetibilidade a intervenções terapêuticas. A cápsula influencia diretamente na eficácia de vacinas e na resposta imune do hospedeiro, motivo pelo qual é considerada um alvo central em estratégias profiláticas (BRILES et al., 2019).

Atualmente, encontram-se disponíveis no mercado dois tipos principais de vacinas profiláticas contra *Streptococcus pneumoniae*: a vacina pneumocócica polissacarídica 23-valente (PPV23), desenvolvida por meio da purificação de antígenos capsulares de 23 sorotipos mais frequentemente associados a infecções invasivas, e as vacinas pneumocócicas conjugadas (PCV), compostas por polissacarídeos capsulares conjugados a proteínas carreadoras que potencializam a resposta imunológica (MATANOCK et al., 2019). No Brasil, são amplamente utilizadas as versões 10-valente (PCV10) e 13-valente (PCV13), enquanto formulações mais recentes — como as vacinas 15-valente (PCV15) e 20-valente (PCV20) — foram recentemente aprovadas para uso em

alguns países do hemisfério norte (PÓVOA et al., 2024).

Embora a vacinação pneumocócica baseada em polissacarídeos capsulares tenha demonstrado eficácia significativa na redução de casos de doença invasiva em adultos saudáveis, ela apresenta limitações, como a incapacidade de prevenir a colonização da nasofaringe, eficácia reduzida em idosos e pacientes imunocomprometidos, proteção restrita, o que promove a substituição de sorotipos, que ocorre porque os diferentes sorotipos competem entre si para colonizar o trato respiratório e quando a vacina elimina os sorotipos-alvo dá espaço para aqueles não contemplados pelas vacinas se multiplicarem (CONVERSO et al., 2020). Essas limitações evidenciam a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias vacinais, como as vacinas conjugadas (PCVs) que utilizam o CPS ligado a proteínas carreadoras para contornar a baixa imunogenicidade em crianças e promover a imunidade de rebanho (PATON; TRAPPETTI, 2019).

Adicionalmente, mesmo apesar dos obstáculos, novas gerações de imunizantes podem ser exploradas para incorporar proteínas altamente conservadas, como a PspA, para induzir resposta imunológica cruzada e, assim, ampliar a proteção conferida à população, vacinas baseadas em antígenos proteicos continuam sendo a melhor alternativa para combater a carga das doenças pneumocócicas (BRILES et al., 2019; CONVERSO et al., 2020).

A elevada variabilidade entre os sorotipos é responsável pelas diferentes manifestações clínicas observadas no hospedeiro, bem como pelas distintas respostas imunológicas induzidas pelas vacinas, sendo possível inclusive competirem entre si em colonização simultânea de diferentes sorotipos em um mesmo hospedeiro (SHAK; VIDAL; KLUGMAN, 2013).

Segundo estudos descritos por Henriques et al. (2000) e Sjöström et al. (2006) a prevalência de achados de cada sorotipo podem variar de acordo com o país, região e população, além de diferentes sorotipos serem mais ou menos virulentos, os autores indicam que os sorotipos 3, 6B e 19F estão entre os mais virulentos, apresentando maiores taxas de letalidade (CFR). O sorotipo 3, em especial, sendo reconhecido por sua alta virulência e ampla disseminação, predominante em países como Estados Unidos e Espanha. Em contraste, o sorotipo 14 foi descrito como o mais frequente em regiões como Suécia e Canadá, destacando-se também por ser o mais comum entre cepas de pneumococos não sensíveis à penicilina (PNSP), seguido pelos sorotipos 19F e 23F.

Já os sorotipos 2 (D39) e 4 (TIGR) são amplamente utilizados como modelos de referência

em pesquisa, em estudos de virulência, patogênese e sensibilidade a antimicrobianos, pela sua alta virulência e relevância clínica, recorrentemente associado a um alto número de infecções. Além disso, ambas as cepas possuem sua caracterização genética muito bem detalhada, pois os seus genomas já foram completamente sequenciados e registrados, facilitando a comparação de resultados e a investigação de mecanismos de ação e resistência (SLAGER; APRIANTO; VEENING, 2018).

Esses achados exemplificam como os sorotipos podem diferir entre si e ressaltam a importância de compreender as variações geográficas e genéticas entre os sorotipos de *S. pneumoniae*, uma vez que tais diferenças influenciam diretamente na gravidade clínica das infecções e a eficácia das estratégias de controle e vacinação (HENRIQUES et al., 2000; SJÖSTRÖM et al., 2006).

A parede celular também é um elemento estrutural importante, composta de peptidoglicanos e ácido teicóico, que contém proteínas âncora fundamentais para a adesão da bactéria às células epiteliais, como a PspA (proteína de superfície pneumocócica A), a PspC (Proteína de superfície pneumocócica C) e a PsaA (Adesina de superfície pneumocócica A). Essas proteínas atuam em sinergia como ligantes para receptores presentes na mucosa respiratória, inibindo a ativação do sistema complemento e favorecendo a colonização e invasão tecidual (KADIOGLU et al., 2008; LI et al., 2007;).

A PspC, também conhecida como CbpA, complementa a ação da PspA ao se ligar ao fator H do complemento e à proteína da polimerase secretora A (pIgR) nas células do hospedeiro, facilitando a translocação da bactéria através do epitélio e sua disseminação pela corrente sanguínea. A atuação conjunta dessas proteínas evidencia o grau de especialização do pneumococo na evasão imune e na exploração das vias fisiológicas humanas para sua propagação (LOUGHRAN, ORIHUELA e TUOMANEN, 2019).

Já a PsaA é uma proteína transportadora de metal essencial para a sobrevivência bacteriana, especialmente em ambientes com limitação de nutrientes como zinco e manganês. Ao permitir a captação desses elementos, a PsaA contribui para a resistência ao estresse oxidativo, à ação de neutrófilos e à atividade de peptídeos antimicrobianos, como as defensinas humanas (KADIOGLU et al., 2008).

A PspA está presente em praticamente todos os isolados clínicos de *Streptococcus*

pneumoniae, independentemente do sorotipo capsular, sendo considerado um fator de virulência essencial para o patógeno. É uma proteína multifuncional, com organização estrutural modular que permite tanto a evasão imune quanto a adesão e sobrevivência bacteriana, sendo um alvo relevante para o desenvolvimento de vacinas e terapias contra *S. pneumoniae* (LANE et al., 2022).

Apesar de apresentar variabilidade estrutural, suas principais regiões imunogênicas são conservadas e reconhecidas pelo sistema imunológico, a proteína é predominantemente alfa-helicoidal, com formato de bastão alongado, ancorada à parede celular pela extremidade C-terminal hidrofóbica. Com tamanho molecular que varia de 67 a 99 kDa. A PspA é composta por regiões distintas, a metade N-terminal A PspA é uma proteína de superfície praticamente onipresente em cepas clínicas de *Streptococcus pneumoniae* e exibe organização modular. Inicia-se com um peptídeo sinal N-terminal, seguido por um domínio α -helicoidal altamente carregado (α HD), uma região rica em prolina (PRD), um domínio de ligação à colina (CBD) composto por repetições de 20 aminoácidos e uma curta cauda hidrofóbica C-terminal (HOLLINGSHEAD et al., 2000; LANE et al., 2022).

A região N-terminal é um trecho curto e hidrofóbico, conhecida por ser sorologicamente variável, é a principal fonte de variabilidade antigênica entre cepas (famílias e clados), é capaz de induzir respostas imunes protetoras, guiando a PspA para fora do citoplasma, atravessando a membrana citoplasmática. O domínio alfa-helicoidal, altamente antigênico, é uma “haste” alongada responsável pela indução de anticorpos protetores através de reconhecimento por epítomos, esse domínio participa da interação com componentes do hospedeiro e está ligado à imunogenicidade, por isso é um foco em estudos vacinais (HOLLINGSHEAD et al., 2000; LANE et al., 2022).

O segmento rico em Prolina (PRD) atua tende a formar estruturas mais rígidas/“quebradas”, atuando como espaçador e articulador entre a haste α -helicoidal e a âncora de parede Essa arquitetura confere flexibilidade mecânica, ajudando a atravessar a cápsula e pode contribuir para resistência, mantendo a orientação e o alcance da PspA na superfície.

Já a cauda hidrofóbica C-terminal é um pequeno trecho no final da PspA que ajuda a finalizar a estrutura da proteína. Embora a ancoragem principal à parede celular seja feita pelo CBD, essa cauda contribui para a estabilidade e o bom dobramento da extremidade C-terminal, facilitando a maturação e o posicionamento corretos da PspA na superfície. Em outras palavras, ela não prende

a proteína à parede, mas ajuda a montar e a orientar os demais domínios para que fiquem bem expostos e funcionem como esperado (HOLLINGSHEAD et al., 2000; LANE et al., 2022). Na Figura 1 é possível observar uma representação gráfica da estrutura da PspA ligada ao pneumococo.

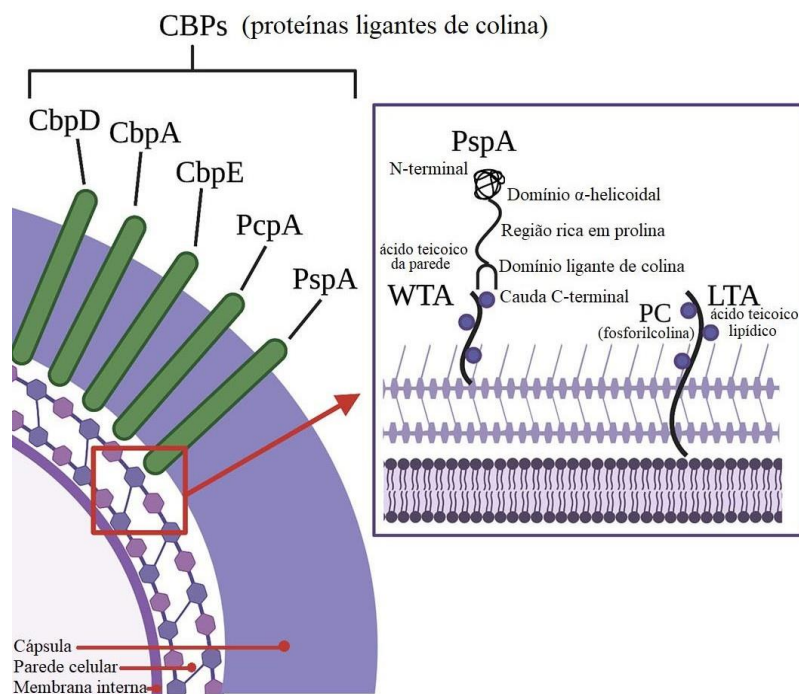


FIGURA 1. Estrutura da PspA. Alguns dos fatores de virulência do *Streptococcus pneumoniae*, proteínas de ligação à colina. A imagem inserida mostra a PspA ligada à fosforilcolina na parede celular, com ácido teicóico e ácido lipoteicóico como parte da parede celular e da membrana, respectivamente. Legenda: Proteína de ligação à colina D (CbpD), Proteína de ligação à colina A (CbpA), Proteína de ligação à colina E (CbpE), Proteína de ligação à colina pneumocócica A (PcpA), Proteína de superfície pneumocócica A (PspA), Ácido teicóico de parede (WTA), Fosforilcolina (PC), Ácido lipoteicóico (LTA). *Fonte: figura adaptada de L et al. (2022).*

A proteína de superfície pneumocócica A (PspA) apresenta elevada variabilidade genética e estrutural, sendo classificada em diferentes famílias e clados, do ponto de vista de organização e variabilidade. Essa diversidade é determinada pelo segmento N-terminal: diferenças no α HD sustentam a classificação em famílias (1, 2 e 3) e subdivididas em clados (1 a 6), sendo as famílias 1 e 2 as mais prevalentes entre isolados clínicos de *Streptococcus pneumoniae*.

Em contraste, as porções C- terminais, incluindo o CBD, tendem a ser mais conservadas. Essa assimetria estrutural acompanha a genética do *pspA*, um gene em mosaico, moldado por recombinações intragênicas que alternam blocos de sequência conservados e divergentes. Em termos práticos, a soma de um esqueleto modular bem definido com um N-terminal altamente variável ajuda a entender, ao mesmo tempo, como a PspA se ancora e se projeta na superfície e por que existe tamanha variação de fenótipos antigênicos entre as diferentes cepas. (HOLLINGSHEAD et al., 2000; REN et al., 2003).

Os diferentes clados de PspA distinguem-se principalmente pela sequência e pela organização do domínio α -helicoidal N-terminal, que corresponde à porção da proteína exposta na superfície bacteriana e funcionalmente mais relevante. Essa região participa diretamente da interação do pneumococo com componentes da imunidade inata do hospedeiro, como o sistema complemento, a lactoferrina e os peptídeos antimicrobianos. Alterações estruturais nesse domínio podem modificar propriedades físico-químicas da superfície bacteriana, incluindo carga elétrica, hidrofobicidade e grau de exposição da proteína, o que, por sua vez, influencia a capacidade da PspA de interferir na ação de moléculas antimicrobianas, como a defensina humana HNP-I (ZHARKOVA et al., 2019)

Embora as PspAs apresentem uma organização modular semelhante — com um domínio N-terminal exposto, uma região rica em prolina e um domínio C-terminal responsável pela ancoragem à parede celular —, pequenas diferenças entre os clados podem impactar a eficiência da proteção bacteriana frente às diversas pressões impostas pelo sistema imune. Evidências da literatura indicam que PspAs de clados distintos variam quanto à afinidade por moléculas do hospedeiro e à capacidade de inibir a deposição de complemento, sugerindo que essa diversidade contribui para a adaptação do pneumococo a diferentes nichos do hospedeiro (ZHARKOVA *et al.*, 2019)

A PspA é fundamental para a virulência do pneumococo, exerce múltiplas funções no processo infeccioso, interfere diretamente na deposição de C3b e na ligação de CRP, bloqueando as vias clássica e alternativa do complemento e, assim, reduzindo opsonização e fagocitose. Além disso, sua presença está diretamente associada à persistência do pneumococo no trato respiratório e à sua capacidade de provocar doença sistêmica, a PspA neutraliza peptídeos antimicrobianos do hospedeiro ao se ligar e sequestrar lactoferrina e indolicidina, o que a torna um dos alvos mais estudados em pesquisas de imuno proteção (BRILES et al., 2019; TU et al., 1999).

A autolisina LytA é outro fator de virulência que merece destaque. Trata-se de uma enzima que degrada o peptidoglicano da parede celular em situações específicas, contribuindo para a liberação de componentes imunomoduladores e facilitando a evasão do sistema imune. Curiosamente, a atividade autolítica também pode desencadear resposta inflamatória exacerbada no hospedeiro, agravando o quadro clínico (LOUGHRAN; ORIHUELA; TUOMANEN, 2019).

O conjunto diversificado de proteínas de superfície do pneumococo oportuniza a evasão da resposta imune mediada pelo sistema complemento. Entre essas estratégias, destacam-se as estruturas semelhantes a fimbrias, formados principalmente pelas proteínas RrgA, RrgB e RrgC. Essas estruturas têm papel central na adesão às células epiteliais e na interação com componentes do sistema imune (ANDRÉ et al., 2017).

A proteína RrgA, em especial, atua como adesina, promovendo a ligação às células do trato respiratório e interagindo com o receptor de complemento 3 (CR3) presente em macrófagos. Essa interação facilita a internalização bacteriana e aumenta a sobrevivência intracelular, contribuindo para a disseminação sistêmica da infecção. Paralelamente, outras proteínas, como PepO, Eno, GAPDH, PGK e Tuf, participam da ligação ao plasminogênio, processo que auxilia na degradação da matriz extracelular e na inativação de componentes do complemento (C3 e C3b), reduzindo a opsonização e a fagocitose. Em conjunto, esses mecanismos reforçam a capacidade do pneumococo de colonizar e permanecer no hospedeiro e evidenciam o potencial dessas proteínas de interferir diretamente na colonização e evasão imunológica (ANDRÉ et al., 2017).

Além das proteínas e da cápsula, o pneumococo produz toxinas e enzimas que intensificam seu poder patogênico. A pneumolisina, por exemplo, é uma toxina citolítica que forma poros em membranas celulares, promovendo lise de células do epitélio respiratório, hemácias e leucócitos, além de induzir liberação de citocinas pró-inflamatórias, exacerbando a resposta imune e favorecendo a disseminação bacteriana (BROOKS; MIAS, 2018).

A produção coordenada desses fatores de virulência é regulada por sistemas de sinalização intercelular, como os sistemas de *quorum sensing*, que permitem ao pneumococo adaptar seu comportamento às condições ambientais e à densidade populacional. Essa capacidade regulatória reforça o entendimento de que o pneumococo é um organismo estrategicamente programado para sobreviver e se propagar no hospedeiro humano (CHERAZARD et al., 2017).

No contexto clínico, o *S. pneumoniae* é reconhecido por sua habilidade em causar doença

grave mesmo em indivíduos previamente saudáveis. Sua ação é significativa quando atinge a corrente sanguínea ou o sistema nervoso central, situações nas quais os mecanismos de evasão imunológica e invasão tecidual são explorados ao máximo pela bactéria (BRISSAC et al., 2021).

A Figura 2 ilustra os principais fatores de virulência do *S. pneumoniae*, incluindo as proteínas de superfície PspA e PspC, a PsaA, a autolisina LytA e outros elementos ancorados na parede e membrana celulares. (KADIOGLU et al., 2008).

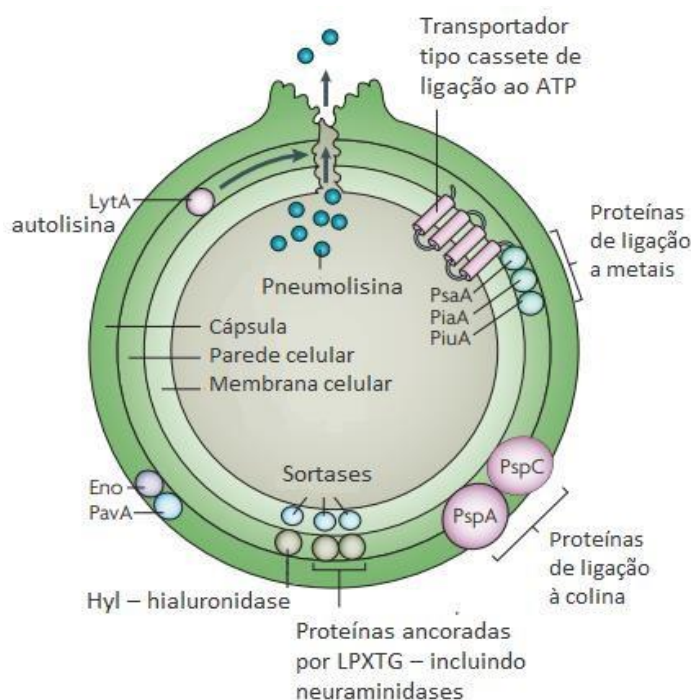


FIGURA 2. Mecanismos de evasão do sistema imune por *Streptococcus pneumoniae*. O pneumococo apresenta múltiplas estratégias de evasão. A cápsula polissacarídica, localizada na superfície externa bacteriana, constitui a principal barreira contra a fagocitose. Entre os fatores de inibição da fagócitos destacam-se PspA e PspC. A modulação da resposta imune é mediada por pneumolisina, autolisina (LytA), proteínas ancoradas por motivo LPXTG (incluindo neuraminidases), hialuronidase (Hyl) e enolase (Eno). Além disso, as proteínas de ligação a metais (PsaA, PiaA, PiuA) contribuem para a sobrevivência bacteriana no hospedeiro. *Fonte: figura adaptada de KADIOGLU et al. (2008).*

Estudos recentes indicam que a combinação entre cápsula espessa, presença de proteínas de superfície funcionais e secreção de toxinas está diretamente associada à letalidade dos casos de pneumonia invasiva, sobretudo em crianças pequenas e idosos. Essa letalidade reforça a

importância do conhecimento detalhado dos fatores de virulência como base para intervenções terapêuticas e preventivas eficazes (HUME-NIXON et al., 2022).

A compreensão da estrutura da parede celular e da membrana do pneumococo também é essencial para o desenvolvimento de terapias baseadas em peptídeos antimicrobianos. Tais terapias buscam explorar as fragilidades estruturais do patógeno, como porosidades, cargas de superfície e composição lipídica, para otimizar a ação de compostos como a alfa-defensina humana (ASSONI et al., 2020).

A pressão seletiva exercida pelo uso extensivo de antibióticos tem resultado no surgimento de cepas resistentes, muitas das quais mantêm sua virulência inalterada. Essa constatação destaca o valor estratégico de compreender os fatores de virulência em paralelo com os mecanismos de resistência, para o desenvolvimento de terapias sinérgicas (CILLÓNIZ et al., 2016).

A resistência a antimicrobianos não necessariamente implica perda de virulência; ao contrário, cepas multirresistentes frequentemente apresentam maior persistência e adaptabilidade nos tecidos do hospedeiro. Por isso, a vigilância epidemiológica e molecular precisa considerar os perfis de virulência e não apenas a suscetibilidade aos antibióticos (CHERAZARD et al., 2017).

O pneumococo também é capaz de formar biofilmes em superfícies mucosas, um comportamento que contribui para sua persistência crônica e dificulta a penetração de agentes antimicrobianos. A formação de biofilme envolve regulação genética específica e a participação de proteínas como a PspC, além de favorecer a recombinação genética entre cepas (BROOKS; MIAS, 2018).

Essa plasticidade genética do pneumococo, associada à sua competência natural para transformação, permite aquisição rápida de novos genes de virulência ou resistência, o que o torna um patógeno altamente dinâmico. Essa habilidade complica o controle epidemiológico e desafia o desenvolvimento de vacinas de ampla cobertura (BRILES et al., 2019).

Portanto, compreender a arquitetura estrutural e funcional dos fatores de virulência do *Streptococcus pneumoniae* é essencial não apenas para o entendimento da sua biologia, mas também para o enfrentamento das doenças por ele causadas. As interações entre cápsula, proteínas de superfície e toxinas revelam um patógeno estrategicamente adaptado a persistir, invadir e resistir (KADIOGLU et al., 2008).

Diante desse panorama, torna-se evidente que qualquer abordagem terapêutica ou preventiva eficaz contra o pneumococo exige um olhar integrado sobre seus mecanismos de virulência, sua estrutura celular e sua relação com o hospedeiro. Tal compreensão é o ponto de partida para intervenções mais eficazes e menos vulneráveis à evolução bacteriana (BRISSAC et al., 2021).

As infecções causadas pelo *Streptococcus pneumoniae* permanecem como um relevante problema de saúde pública em escala global, especialmente diante da sua elevada capacidade de adaptação e resistência. Em paralelo ao desenvolvimento de estratégias profiláticas, como as vacinas conjugadas, e terapêuticas, como os antibióticos de amplo espectro, observa-se uma crescente necessidade de aprofundar a compreensão dos mecanismos que regulam a resposta imunológica inata contra o pneumococo, sobretudo frente à emergência de cepas com mutações em genes de virulência.

Nesse cenário, os peptídeos antimicrobianos, como a alfa-defensina humana-1 (HNP-I), surgem como elementos centrais da imunidade inata, com capacidade de interferir de forma direta na integridade de microrganismos patogênicos, atuando como verdadeiro sentinela molecular no combate às infecções (GAO; SHAG; WANG, 2021). A crescente preocupação com a resistência bacteriana, no entanto, impõe um desafio significativo à compreensão e ao aprimoramento das estratégias terapêuticas disponíveis, demandando abordagens que considerem não apenas os agentes antimicrobianos, mas também a complexidade genética dos próprios patógenos.

Estudos como os de Mahlapuu et al. (2016) já demonstraram que a eficácia dos peptídeos antimicrobianos depende, em grande medida, da conformação estrutural das membranas bacterianas e da presença de elementos de virulência, o que torna essencial uma abordagem que contemple essas variáveis de modo integrado.

Além disso, a compreensão dos efeitos de mutações específicas na suscetibilidade ao HNP-I poderá oferecer subsídios importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, especialmente frente ao aumento alarmante de cepas resistentes aos antibióticos tradicionais. Cherazard et al. (2017) alertam para o impacto clínico dessa resistência e para a necessidade de alternativas baseadas em moléculas naturais com potencial antimicrobiano. A defensina humana, nesse sentido, representa não apenas uma molécula funcional, mas também um modelo para o desenvolvimento de agentes sintéticos que mimetizam sua ação.

1.2. Peptídeos antimicrobianos e sua ação sobre o pneumococo

O sistema imunológico inato representa a primeira linha de defesa contra microrganismos patogênicos e, nesse contexto, os peptídeos antimicrobianos (AMPs) desempenham papel crucial como componentes moleculares efetores. Produzidos por diversas células e tecidos em mamíferos e outros organismos, os AMPs atuam de forma rápida e direta na neutralização de bactérias, vírus e fungos, interferindo com a integridade da membrana microbiana ou desencadeando processos internos que levam morte direta do patógeno, podendo ainda atuar de forma indireta, por meio da modulação de respostas do sistema imune do hospedeiro, caracterizando uma atividade imunomoduladora. Ademais, diversos estudos têm demonstrado seu potencial efeito antitumoral, com atividade contra diferentes tipos de câncer (DI; DESLOUCHES, 2017). Dentre eles, destacam-se as defensinas humanas, como a HNP-I, cuja relevância vem sendo cada vez mais reconhecida no enfrentamento a patógenos como o *Streptococcus pneumoniae* (GAO; SHANG; WANG, 2021).

A ação dos AMPs sobre o pneumococo envolve, em geral, interações eletrostáticas entre os resíduos catiônicos dos peptídeos e os fosfolipídios aniônicos da membrana bacteriana. Essas interações facilitam o ancoramento inicial do peptídeo à superfície celular, seguido por sua inserção na bicamada lipídica, o que pode levar à formação de poros, despolarização da membrana, vazamento de conteúdos citoplasmáticos e morte celular. Essa via de ação direta tem sido um dos pilares da eficácia dos AMPs contra bactérias Gram-positivas, mesmo em casos de resistência a antibióticos convencionais (MAHLAPUU et al., 2016).

No caso específico do *S. pneumoniae*, a presença da cápsula polissacarídica espessa representa um obstáculo físico relevante para o acesso de peptídeos antimicrobianos à membrana plasmática. Ainda assim, estudos têm demonstrado que certos AMPs, incluindo as defensinas, são capazes de transpor essa barreira com relativa eficácia, sobretudo em cepas mutantes com alterações nos genes capsulares ou em condições de menor expressão da cápsula (ASSONI et al., 2020).

Os AMPs estão distribuídos amplamente entre diferentes organismos, desde plantas até mamíferos, o que evidencia seu papel conservado como componentes essenciais da defesa contra infecções. Eles são encontrados em praticamente todos os reinos da vida, de plantas e invertebrados até mamíferos superiores, o que sugere que a seleção natural favoreceu esses peptídeos como defesa fundamental contra infecções, com ajustes estruturais específicos para os desafios

ambientais de cada espécie. No caso dos humanos, as defensinas representam uma resposta ancestral altamente especializada (MACHADO; OTTOLINI, 2015).

A literatura destaca que os AMPs apresentam grande diversidade estrutural, e essa variação influencia diretamente o modo como cada peptídeo interage com diferentes microrganismos. Embora compartilhem propriedades como pequeno tamanho, carga positiva e anfipatia, sua conformação tridimensional pode variar consideravelmente, influenciando diretamente seu mecanismo de ação. De modo geral, os AMPs são classificados em quatro grandes grupos estruturais: α -hélice, folha β (β -sheet), estruturas estendidas e estruturas mistas (α/β). Essa diversidade estrutural se reflete na especificidade funcional de cada AMP, já que diferentes conformações favorecem modos distintos de interação com membranas e alvos celulares. (LAZZARO, ZASLOFF e ROLFF, 2020).

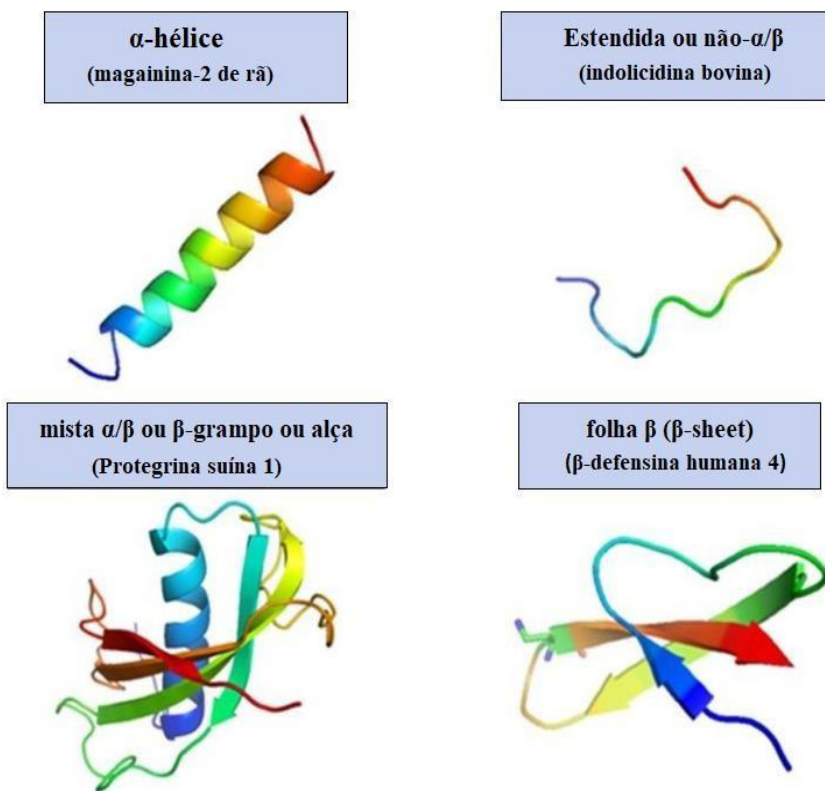


FIGURA 3. Principais classes estruturais de peptídeos antimicrobianos com base em sua conformação tridimensional. São mostradas a α -hélice da magainina-2 de rã, a estrutura estendida da indolicidina bovina, a conformação β -sheet da β -defensina humana 4 e a estrutura mista α/β da protegrina suína. *Fonte: figura adaptada de LOPES et al. (2022).*

A Figura 3 representa graficamente as quatro principais arquiteturas moleculares observadas em AMPs. Na imagem, observa-se a α -hélice da magainina-2 de rã, a estrutura estendida da indolicidina bovina, a conformação β -sheet da β -defensina humana 4 e a estrutura mista α/β da protegrina suína. Essa diversidade estrutural tem implicações diretas na forma como os peptídeos interagem com a membrana bacteriana, seja formando canais transmembranares, seja desestabilizando os fosfolipídios pela lateralidade (GAO; SHANG; WANG, 2021).

Uma das principais famílias de peptídeos antimicrobianos catiônicos envolvidas na resposta imune inata é a das defensinas. Esses peptídeos são classificados em duas grandes categorias: defensinas humanas (HDs) e peptídeos de neutrófilos humanos (HNPs), sendo os subtipos HNP-I a HNP-4 os mais estudados. Dentre eles, destaca-se o HNP-I, uma α -defensina secretada predominantemente por neutrófilos, com potente atividade antimicrobiana, atuando principalmente por meio da inibição da síntese proteica em microrganismos (BIN HAFEEZ et al., 2021). As defensinas constituem a classe mais abundante de peptídeos antimicrobianos da imunidade inata humana, sendo produzidas em resposta à ativação dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), e expressas principalmente por neutrófilos e células epiteliais (MIN, J. et al., 2023).

Diversos estudos descrevem a existência de seis grupos distintos de α -defensinas em humanos, os quais se diferenciam quanto à organização gênica e ao padrão de expressão tecidual. As α -defensinas mieloides, também conhecidas como peptídeos de neutrófilos humanos 1 a 3 (HNP1, HNP2 e HNP3), são sintetizadas nos promielócitos da medula óssea e armazenadas nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. O HNP4, apesar de apresentar uma estrutura similar aos demais HNPs, exibe modificações funcionais atribuídas a variações na sua sequência de aminoácidos; além disso, pode ser expresso em monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, bem como em células natural killer. Já as α -defensinas humanas 5 e 6 (HD5 e HD6) são classificadas como entéricas. Embora compartilhem a estrutura geral com as defensinas mieloides, distinguem-se pela composição específica de aminoácidos. Essas últimas são expressas predominantemente nas células de Paneth, localizadas nas criptas do intestino delgado (ZHAI et al., 2023).

Estruturalmente, a alfa-defensina humana-1 (HNP-I) pertence à classe folha- β e possui uma conformação estável conferida por pontes de dissulfeto entre cisteínas, o que lhe confere resistência a proteólise e estabilidade funcional em ambientes fisiológicos adversos. A disposição dos resíduos

hidrofóbicos e hidrofílicos em sua estrutura favorece sua inserção seletiva em membranas bacterianas, levando à lise celular. Diferente de antibióticos clássicos que atuam em alvos intracelulares específicos, a HNP-I exerce sua ação no nível da membrana, o que reduz significativamente a probabilidade de surgimento de resistência (HEIN et al., 2022).

As defensinas atuam por diferentes vias, por meio de múltiplos mecanismos que afetam diretamente a integridade e a funcionalidade das células patogênicas. A ruptura da membrana bacteriana é um dos mecanismos de ação mais descritos na literatura bacteriana, promovida pela formação de poros que desestabilizam sua estrutura. Além disso, essas moléculas podem interferir na biossíntese da parede celular bacteriana, especialmente por meio da interação com os fosfolipídios presentes nessa estrutura. Suas propriedades hidrofóbicas contribuem para o aumento da permeabilidade da membrana, favorecendo o colapso do gradiente iônico celular. As interações eletrostáticas também são fundamentais: as defensinas, que possuem carga positiva, ligam-se à superfície dos microrganismos, geralmente carregada negativamente, promovendo sua desorganização (GAO; SHANG; WANG, 2021; SELSTED; OUELLETTE, 1995; XU; LU, 2019).

Além do efeito direto sobre as membranas, as defensinas também modulam o sistema imunológico do hospedeiro. Elas são capazes de recrutar células fagocitárias, estimular a liberação de citocinas, promover quimiotaxia e influenciar a maturação de células dendríticas. No contexto da infecção pneumocócica, essas funções adicionais podem atuar sinergicamente com a atividade bactericida, amplificando a resposta imune local e limitando a disseminação do patógeno (CIESLIK et al., 2021).

Enquanto isso WAZ et al. (2022) demonstra que a cápsula polissacarídica do *Streptococcus pneumoniae* modula de forma decisiva a atividade bactericida da indolicidina. Observou-se que a suscetibilidade varia entre sorotipos e está associada à carga superficial: cepas com potencial zeta mais negativo tendem a ser mais resistentes na presença da cápsula, enquanto cargas menos negativas favorecem maior resistência quando a cápsula está ausente. No entanto, anticorpos específicos para a cápsula aumentam a eficácia da indolicidina, sugerindo que respostas mediadas por anticorpos circulantes e por componentes do sistema complemento podem potencializar mecanismos inatos de defesa (WAZ et al., 2022).

A indolicidina, por exemplo, uma catelicidina bovina mostrada na figura 3 como representante da classe estendida, tem demonstrado eficácia contra *S. pneumoniae*, principalmente por sua

capacidade de interagir com o DNA bacteriano, além de sua ação na membrana. Sua estrutura não conformada de forma clássica (não- α/β) permite uma flexibilidade maior de interação com múltiplos alvos moleculares dentro da célula bacteriana (JINDAL et al., 2015).

Segundo Waz et al. (2024), a proteína de superfície pneumocócica A (PspA) exerce um papel protetor essencial ao *Streptococcus pneumoniae* frente à ação bactericida da indolicidina, demonstrando que cepas desprovidas de PspA apresentam maior susceptibilidade à indolicidina, evidenciando que essa proteína atua como um escudo molecular capaz de sequestrar o peptídeo antes que este interaja com a membrana bacteriana. Ainda segundo os pesquisadores, “a PspA se liga diretamente à indolicidina, formando um complexo detectável por espectrometria de massas, o que confirma a interação física entre essas moléculas” (WAZ et al., 2024). Essa interação direta representa um mecanismo de evasão da imunidade inata, pelo qual o pneumococo neutraliza peptídeos antimicrobianos do hospedeiro, reforçando a importância da PspA tanto na virulência quanto como alvo estratégico para o desenvolvimento de vacinas.

Já os peptídeos α -helicoidais, como a magainina-2, possuem alta capacidade de inserção transmembrana, formando poros e canais iônicos que desequilibram o gradiente osmótico e causam a morte celular. No entanto, sua ação pode ser limitada contra bactérias com cápsulas espessas, como o pneumococo, o que reforça a vantagem das β -defensinas nesse tipo de infecção (MAHLAPUU et al., 2016).

Estudos de modelagem molecular e simulações computacionais têm revelado que a estrutura folha- β das defensinas humanas facilita a formação de complexos estáveis com fosfolipídios da membrana bacteriana, mesmo em presença de barreiras extracelulares. Esse comportamento ajuda a explicar a eficácia da HNP-I contra cepas de pneumococo que expressam os fatores de virulência, como a cápsula polissacarídica (antifagocítica), a toxina pneumolisina e proteínas de superfície ligantes de colina (PspA/PspC), entre outros (HEIN et al., 2022).

Por outro lado, a resistência aos AMPs pode surgir por mecanismos adaptativos do patógeno, como modificação da carga da superfície celular, aumento da expressão de proteínas ligadoras de lipídios ou secreção de proteases que degradam os peptídeos. Tais estratégias são comuns entre bactérias Gram-negativas, mas também têm sido observadas em Gram-positivas como o pneumococo, embora com menor frequência (ASSONI et al., 2020).

Ainda assim, a grande vantagem dos AMPs reside em sua multifuncionalidade e na

difículdade de desenvolvimento de resistência cruzada. Como atuam por mecanismos físicos e não enzimáticos, eles impõem ao patógeno a necessidade de múltiplas mutações simultâneas para evitar sua ação, o que torna o processo evolutivamente custoso (LAZZARO; ZASLOFF; ROLFF, 2020).

Diante da crescente resistência aos antibióticos convencionais, os AMPs surgem como alternativas terapêuticas promissoras. Vários compostos derivados de defensinas estão atualmente em fase de testes pré-clínicos e clínicos, sendo avaliados não apenas por sua ação bactericida, mas também por sua biocompatibilidade, toxicidade reduzida e potencial sinérgico com outras drogas (MAHLAPUU et al., 2016).

A aplicação clínica de AMPs ainda enfrenta desafios, como estabilidade *in vivo*, biodisponibilidade e custo de produção. Contudo, estratégias como modificação de resíduos aminoácidos, encapsulamento em nanopartículas ou conjugação com moléculas-alvo têm sido empregadas para superar essas limitações e tornar esses peptídeos viáveis para uso terapêutico contra infecções pneumocócicas (HEIN et al., 2022).

Do ponto de vista imunológico, é importante considerar que a ação dos AMPs não se limita à erradicação do patógeno, mas também influencia o microambiente inflamatório. A regulação dessa resposta é fundamental para evitar lesões colaterais ao tecido hospedeiro, o que exige um equilíbrio delicado entre atividade antimicrobiana e modulação imune (CIESLIK et al., 2021).

Em síntese, os peptídeos antimicrobianos, com suas diferentes estruturas e mecanismos de ação, representam ferramentas evolutivamente conservadas e funcionalmente versáteis no combate ao *S. pneumoniae*. Sua eficácia depende não apenas da interação direta com a célula bacteriana, mas também do contexto imunológico em que essa interação ocorre, da composição estrutural do patógeno e da presença de fatores de virulência.

Portanto, a compreensão aprofundada das características estruturais e funcionais dos AMPs, especialmente das defensinas humanas como a HNP-I, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes contra infecções pneumocócicas. Isso inclui tanto o uso direto desses peptídeos quanto sua combinação com outras abordagens imunológicas e farmacológicas.

1.3. Resistência bacteriana aos peptídeos antimicrobianos

A potencialização da resistência antimicrobiana constitui um dos maiores desafios da saúde

pública. No contexto dos peptídeos antimicrobianos (AMPs), considerados uma alternativa promissora aos antibióticos convencionais, a resistência bacteriana assume formas menos evidentes, mas nem por isso menos eficazes. Embora os AMPs atuem por mecanismos físicos e bioquímicos que dificultam o desenvolvimento de resistência direta, as bactérias têm demonstrado grande capacidade de adaptação, inclusive contra esses agentes (ASSONI et al., 2020).

Enquanto antibióticos convencionais atuam em alvos intracelulares definidos, os AMPs costumam agir diretamente sobre a membrana bacteriana celular, desestabilizando sua estrutura ou criando poros que provocam lise. Mesmo assim, durante muito tempo acreditou-se que a resistência a esses peptídeos fosse rara, estudos recentes mostram que algumas bactérias Gram-positivas desenvolveram estratégias, tanto passivas quanto reguladas, que reduzem a eficácia desses peptídeos, falcomo modulação de superfície, sequestro eletrostático e respostas regulatórias ao estresse, desafiando essa visão inicial (MAHLAPUU et al., 2016).

Revisões reforçam o papel central dos AMPs na defesa inata e seu potencial terapêutico, mas destacam obstáculos ao uso clínico, como toxicidade e fatores do hospedeiro que podem atenuar a atividade, e propõem estratégias como modificações peptídicas e combinações de AMPs para potencializar antibióticos e retardar o surgimento de resistência. (ASSONI et al., 2020).

Estudos conduzidos por nosso grupo demonstraram que variações na cápsula polissacarídica influenciam diretamente a resistência do *Streptococcus pneumoniae* à ação da indolicidina, um peptídeo antimicrobiano bovino pertencente à família das catelicidinas. Além da cápsula, evidências indicam que a PspA também desempenha um papel protetor frente à atividade bactericida de peptídeos catiônicos, como a indolicidina e o LL-37, de origem humana, anticorpos anti-PspA podem restaurar e até ampliar a atividade desses AMPs (WAZ et al., 2022).

Em paralelo, o impacto da cápsula sobre a indolicidina é sorotipo-dependente e se relaciona à carga superficial: a presença de CPS reduz a suscetibilidade, a adição de CPS purificada atenua o efeito bactericida e anticorpos anticapsulares ampliam a letalidade do peptídeo, sugerindo que respostas humorais dirigidas à cápsula e à PspA podem sinergizar para desarmar barreiras de superfície do pneumococo. Esses achados consolidam cápsula e PspA como alvos úteis para combinar imunização com terapias baseadas em AMPs (WAZ et al., 2022).

A resistência passiva está relacionada a alterações estruturais da superfície bacteriana que reduzem a afinidade dos AMPs por suas membranas. Em muitos casos, isso ocorre por

modificações na carga superficial dos fosfolipídios que compõem a bicamada lipídica. Como a maioria dos AMPs é catiônica, sua atração por superfícies aniônicas é essencial para a ação antimicrobiana. Quando a célula bacteriana reduz essa carga negativa, por exemplo, por meio da substituição de grupos fosfato por aminos ou açúcares neutros, ela cria uma barreira eletrostática natural contra a entrada dos peptídeos (ASSONI et al., 2020).

Existe mais um mecanismo passivo, este envolve o aumento da espessura da cápsula extracelular, que funciona como uma camada de proteção contra o contato direto entre os AMPs e a membrana plasmática, como pode ser observado na figura 4. No pneumococo, essa cápsula polissacarídica é um importante fator de virulência, que atua como mecanismo físico de resistência, dificultando a difusão dos peptídeos até seus alvos estruturais (BRISSAC et al., 2021).

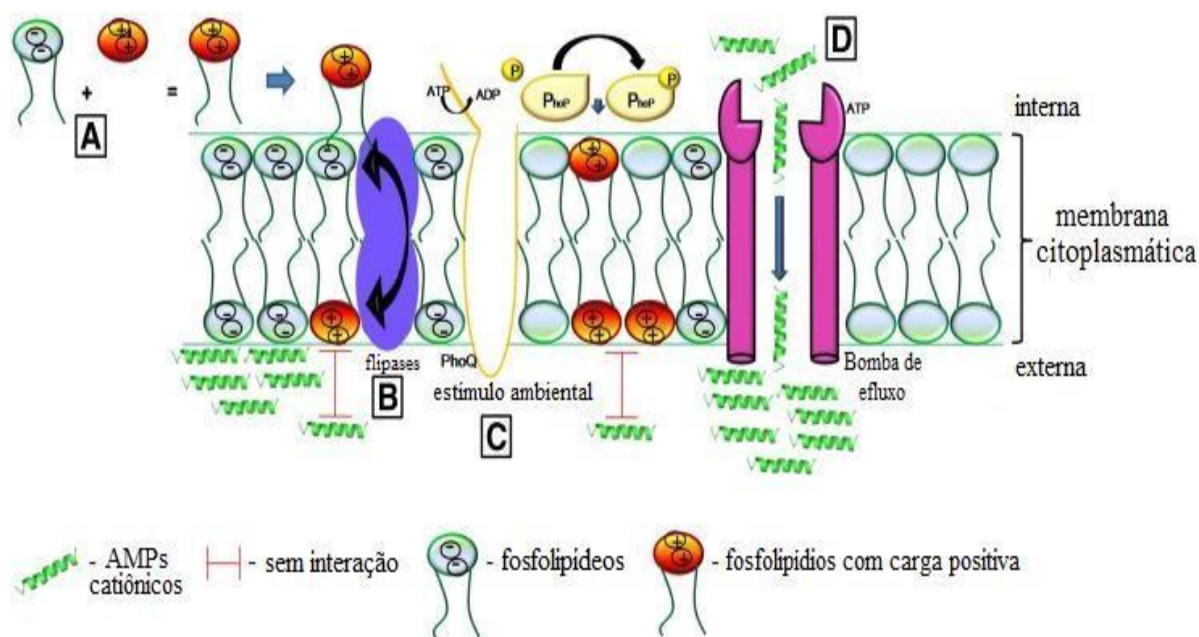


FIGURA 4. Mecanismos moleculares de resistência bacteriana aos peptídeos antimicrobianos catiônicos (cAMPs). A resistência envolve a redução da interação eletrostática entre os cAMPs e a superfície bacteriana por modificações na carga da membrana (A), alterações na composição e organização da membrana citoplasmática que dificultam a inserção e a formação de poros pelos peptídeos (B), ativação de respostas adaptativas mediadas por sensores ambientais e sistemas regulatórios que induzem genes de resistência (C) e a remoção ativa dos cAMPs por bombas de efluxo dependentes de ATP, impedindo o acúmulo de concentrações letais na célula (D). *Fonte: figura adaptada de MARIA-NETO et al. (2015).*

Além da resistência passiva, pneumococo e outras bactérias desenvolveram mecanismos ativos e regulados de defesa contra os AMPs. Esses mecanismos envolvem proteínas de transporte, sistemas sensores e modulações genéticas que permitem respostas rápidas às ameaças externas. Um dos mais relevantes é o sistema PhoP/PhoQ, um sistema regulador de dois componentes que detecta a presença de AMPs no ambiente e desencadeia a expressão de genes envolvidos na resistência (ASSONI et al., 2020).

A modificação lipídica representada na figura 4 ocorre pela substituição de fosfolipídios aniônicos por variantes catiônicas ou neutras, o que reduz a atração eletrostática dos AMPs. Esse processo é frequentemente mediado por enzimas como a flippase, que redistribuem os fosfolipídios entre os folhetos da membrana plasmática, tornando o ambiente superficial menos favorável à ligação dos peptídeos antimicrobianos (ASSONI et al., 2020).

Já o sistema PhoP/PhoQ é ativado quando sensores de membrana identificam alterações no ambiente, como aumento de peptídeos antimicrobianos ou variações de magnésio. Em resposta, há fosforilação do componente regulador e ativação da expressão de genes relacionados à resistência, como os que codificam proteínas modificadoras de lipopolissacarídeos e enzimas que alteram a fluidez da membrana (MAHLAPUU et al., 2016).

Um dos principais fatores de virulência do *Streptococcus pneumoniae* é a presença de proteínas de superfície, entre as quais se destaca a PspA (proteína de superfície do pneumococo A). Além de inibir a deposição de componentes do complemento e reduzir a eficácia da fagocitose, a PspA atua de forma direta contra a resposta imune inata ao interagir com peptídeos antimicrobianos (AMPs) catiônicos. A PspA se liga e sequestra AMPs como lactoferricina (derivada da lactoferrina) e indolicidina, diminuindo o acesso desses peptídeos à membrana bacteriana e atenuando sua atividade bactericida. A PspA reconhece preferencialmente a região N da lactoferrina humana e, por meio de contatos eletrostáticos, bloqueia a porção catiônica lactoferricina, neutralizando seu efeito lítico sobre a membrana. (ANDRÉ et al., 2015; WAZ et al., 2022).

Estudos de Shaper et al. (2004) demonstram que a PspA pode mediar a resistência bacteriana contra a ação de inibição da apolactoferrina (ALF) e de seu derivado peptídico, a lactoferricina (LFN), evidenciando que cepas isogênicas sem o gene *pspA* demonstram uma suscetibilidade acentuada à morte induzida pela ALF, em comparação com mutações em outras proteínas de

superfície, o que indica o papel da PspA na evasão imune. A capacidade protetora não se restringe apenas a proteína ancorada na membrana, uma vez que regiões da porção N-terminal da PspA, e até mesmo um oligopeptídeo de 11 aminoácidos, exibem atividade inibitória direta contra o efeito bactericida da ALF e LFN. A intervenção com anticorpos específicos que se ligam à PspA resulta na potencialização da eficácia antimicrobiana da lactoferrina, sugerindo que a interação PspA-ALF funciona como um mecanismo de "sequestro" ou bloqueio do sítio ativo do componente de defesa inata. O que indica que a PspA age como um alvo molecular estratégico para abordagens terapêuticas que visem remediar a proteção pneumocócica e otimizar a resposta imune inata do hospedeiro (SHAPER *et al.*, 2004).

A interação entre componentes do sistema imune inato, como a lactoferrina humana (ALF) e a lisozima (LZ), potencializa os mecanismos de eliminação de *Streptococcus pneumoniae* pela imunidade inata. Segundo André *et al.* (2015) demonstram que a combinação dessas moléculas exerce um efeito sinérgico, potencializando a eliminação bacteriana em comparação ao uso isolado, especialmente em determinadas cepas do patógeno. A proteína de superfície pneumocócica A (PspA), reconhecida como um importante fator de virulência e candidata vacinal, confere proteção parcial à bactéria frente à ação da ALF. Entretanto, a presença de anticorpos específicos contra PspA aumenta significativamente a susceptibilidade do pneumococo à lise mediada por ALF, mesmo diante da variabilidade estrutural dessa proteína entre diferentes sorotipos. Além disso, verificou-se que a ALF se liga diretamente à superfície bacteriana, interação que pode ser inibida pela presença de anticorpos anti-PspA, sugerindo um mecanismo de ação dependente da modulação dessa proteína. Esses achados reforçam a relevância da interação entre ALF, LZ e PspA na imunidade inata contra o pneumococo e indicam possíveis abordagens imunológicas e terapêuticas para o controle de infecções pneumocócicas (ANDRÉ *et al.*, 2015).

As bombas de efluxo, também ilustradas na figura 4, constituem um mecanismo altamente eficiente de resistência ativa. Elas são capazes de reconhecer, capturar e transportar AMPs para fora da célula, muitas vezes antes que esses atinjam concentrações letais no citoplasma. Alimentadas por energia derivada da hidrólise de ATP, essas bombas reduzem drasticamente a eficácia dos peptídeos, especialmente quando expressas em níveis elevados (ASSONI *et al.*, 2020).

Estudos indicam que, embora o *S. pneumoniae* não apresente tantos sistemas de efluxo quanto bactérias gram-negativas, ele é capaz de modular a expressão de bombas específicas sob

pressão seletiva, o que reforça sua adaptabilidade frente a diferentes desafios antimicrobianos. Esse mecanismo pode ser particularmente importante em cepas hospitalares ou submetidas a uso contínuo de antimicrobianos alternativos (CILLÓNIZ et al., 2016).

Para abordarmos sobre a produção de proteases bacterianas que degradam diretamente os peptídeos antimicrobianos, é preciso compreender que essa forma de resistência é menos comum, mas já foi observada em diversas espécies de estreptococos. A presença dessas enzimas permite que a bactéria inative os AMPs antes mesmo de eles exercerem sua função, comprometendo a resposta imune inata e favorecendo a persistência do patógeno (ASSONI et al., 2020).

A formação de biofilmes também representa um mecanismo indireto, porém eficaz, de resistência. No biofilme, as bactérias se envolvem em uma matriz extracelular polimérica que reduz a penetração de AMPs e antibióticos, além de criar gradientes fisiológicos que tornam os microrganismos metabolicamente menos ativos, dificultando a ação de moléculas dependentes de atividade celular para exercer efeito letal (BROOKS; MIAS, 2018).

Dentro do biofilme, a expressão gênica dos pneumococos pode ser alterada, favorecendo a produção de proteínas de estresse, bombas de efluxo e modificadores de membrana. Isso cria um microambiente protetor coletivo que amplia a tolerância da população bacteriana aos AMPs, mesmo em concentrações que seriam letais em culturas planctônicas (CHERAZARD et al., 2017).

A resistência aos AMPs também pode surgir por pressão seletiva evolutiva. Em experimentos laboratoriais, cepas expostas continuamente a defensinas desenvolvem mutações em genes que regulam a carga de superfície, a composição da parede celular e a fluidez da membrana. Tais mutações nem sempre implicam perda de virulência, o que torna o problema ainda mais complexo do ponto de vista terapêutico (LAZZARO; ZASLOFF; ROLFF, 2020).

Embora as taxas de resistência aos AMPs sejam geralmente menores do que aquelas observadas para antibióticos clássicos, a possibilidade de surgimento de resistência cruzada ou co-seleção com outros mecanismos preocupam os pesquisadores. Por isso, recomenda-se cautela na aplicação terapêutica indiscriminada de AMPs e seus derivados, sob risco de acelerar processos adaptativos bacterianos (MAHLAPUU et al., 2016).

A combinação de AMPs com antibióticos tradicionais tem sido proposta como estratégia para retardar a emergência de resistência. O efeito sinérgico entre as moléculas pode reduzir a dose necessária de cada composto e dificultar a adaptação do patógeno. No entanto, essa abordagem

exige conhecimento detalhado das interações farmacodinâmicas envolvidas (HEIN et al., 2022).

Do ponto de vista imunológico, é importante destacar que os mecanismos de resistência aos AMPs afetam não apenas a eficácia de intervenções exógenas, mas também a funcionalidade da imunidade inata. Uma bactéria resistente a defensinas é, em essência, mais preparada para evadir as defesas naturais do organismo, aumentando o risco de infecções persistentes e invasivas (CIESLIK et al., 2021).

A resistência aos AMPs ainda não constitui um fenômeno de massa como o observado com os antibióticos convencionais, mas os registros crescentes em diferentes patógenos são suficientes para indicar a necessidade de estudos contínuos e políticas de uso racional. Além de comprometer intervenções terapêuticas, a resistência aos AMPs enfraquece mecanismos de defesa que são intrínsecos ao hospedeiro e evolutivamente preservados. (ASSONI et al., 2020).

Os dados reunidos ao longo dos últimos anos indicam que o *Streptococcus pneumoniae*, dispõe de diferentes mecanismos que lhe permitem atenuar a ação de peptídeos antimicrobianos. Essa capacidade adaptativa reforça a necessidade de compreender com maior detalhe como cada fator de virulência contribui para a resistência observada. O entendimento profundo desses mecanismos é fundamental para o avanço do uso clínico dos AMPs e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que considerem tanto a eficácia quanto a sustentabilidade do tratamento ao longo do tempo.

1.4. Justificativa

As infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae* continuam sendo um problema relevante de saúde pública em todo o mundo, associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente em crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Mesmo com o uso amplo de antibióticos e a disponibilidade de vacinas pneumocócicas, o controle desse patógeno ainda enfrenta limitações importantes. O surgimento de cepas resistentes, a substituição de sorotipos e a notável capacidade do pneumococo de evadir a resposta imune do hospedeiro reforçam a necessidade de aprofundar o entendimento dos mecanismos naturais de defesa e das estratégias de sobrevivência bacteriana. Esse estudo propõe avaliar os efeitos da presença de fatores de virulência do *Streptococcus pneumoniae* sob a ação do HNP-I, analisando as diferenças entre cepas selvagens e mutantes negativas para dois fatores de virulência: cápsula polissacarídica e proteína de

superfície A (PspA), bem como os efeitos da adição PspA livre e de anticorpos específicos.

Nesse cenário, a imunidade inata assume papel central, especialmente nos estágios iniciais da infecção, quando a resposta adaptativa ainda não está estabelecida. Entre seus principais efetores estão os peptídeos antimicrobianos, moléculas produzidas naturalmente pelo hospedeiro e capazes de atuar rapidamente contra microrganismos invasores. A alfa-defensina humana HNP-I destaca-se nesse contexto por ser uma das defensinas mais abundantes nos neutrófilos e por estar diretamente envolvida no primeiro contato entre o sistema imune e o pneumococo durante a infecção. Assim, o HNP-I representa um modelo biologicamente relevante para o estudo da interação entre o pneumococo e os mecanismos naturais de defesa do organismo humano.

Apesar de sua reconhecida atividade antimicrobiana, sabe-se que o pneumococo apresenta resistência parcial à ação das alfa-defensinas, indicando a existência de mecanismos específicos de evasão. Estudos prévios, incluindo do nosso grupo de pesquisa, indicam que a proteína PspA tem um papel importante na proteção da bactéria contra peptídeos antimicrobianos catiônicos, como a indolicidina e peptídeos derivados da lactoferrina. No entanto, ainda não está completamente esclarecido se esse efeito protetor se estende às defensinas humanas, em especial ao HNP-I, que apresenta estrutura, modo de ação e contexto imunológico distintos de outros AMPs previamente investigados. Dessa forma, avaliar diretamente a interação entre PspA e HNP-I permite preencher uma lacuna relevante no entendimento da resistência do pneumococo frente à imunidade inata humana.

Em relação à cápsula, os dados da literatura são conflitantes; enquanto alguns estudos sugerem que a cápsula tem um papel protetor, atuando como barreira física contra os peptídeos, outros indicam que determinadas características capsulares sensibiliza o pneumococo tornando-o mais suscetível ao peptídeo. Essas divergências sugerem que o efeito da cápsula não é uniforme, mas depende do sorotipo, da quantidade de cápsula expressa e da interação com outros fatores de superfície. Nesse sentido, a análise conjunta da cápsula e da PspA oferece uma abordagem mais integrada e próxima da realidade biológica enfrentada pelo patógeno durante a infecção.

As diferenças de sensibilidade entre cepas selvagens de *S. pneumoniae* e suas variantes mutantes a peptídeos como a HNP-I também podem ser explicadas pela variação na composição da parede celular e na densidade de carga superficial. A perda da cápsula ou da proteína PspA, por exemplo, pode tornar a membrana mais acessível e exposta à interação com peptídeos catiônicos,

aumentando sua vulnerabilidade à lise (ASSONI et al., 2020).

Estudos que utilizaram cepas mutantes para avaliar o papel de proteínas de superfície como PspA e a cápsula polissacarídica revelaram que essas estruturas, além de contribuírem para a virulência, também servem como mecanismos de resistência passiva aos AMPs. Isso significa que, ao bloquear o acesso direto do peptídeo à membrana, o pneumococo se protege da ação letal da defensina, o que justifica o interesse em investigar cepas modificadas geneticamente (BRISSAC et al., 2021). Portanto, espera-se através desses estudos avaliar de forma mais completa as contribuições da proteína PspA e da cápsula para a ação de HNP sobre dois tipos de pneumococo.

Outro ponto central deste estudo é a avaliação dos efeitos da adição de PspA recombinante e de anticorpos específicos anti-PspA. Essa abordagem possibilita não apenas confirmar o papel direto da PspA na modulação da ação do HNP-I, mas também simular um cenário mais próximo do contexto fisiológico, no qual componentes da imunidade adaptativa podem atuar em conjunto com mecanismos inatos. Este enfoque pode, inclusive, contribuir para a identificação de alvos terapêuticos mais universais ou fragilidades do patógeno que possam ser exploradas farmacologicamente, dessa forma, orientar intervenções mais específicas conforme o perfil da cepa isolada e auxiliar a compreensão dos mecanismos de patogenicidade do pneumococo.

A escolha das cepas D39 (sorotipo 2) e TIGR4 (sorotipo 4) fundamenta-se em sua ampla utilização como modelos clássicos de virulência pneumocócica e em sua relevância clínica. Esses sorotipos apresentam diferenças estruturais e genéticas bem caracterizadas nos loci envolvidos na biossíntese capsular e em genes reguladores, refletindo variações na espessura e organização da cápsula. Além disso, estudos demonstram que mesmo cepas clinicamente relacionadas podem apresentar níveis distintos de capsulação, resultado de mutações espontâneas em genes regulatórios, como *cpsY*, ou de adaptações rápidas frente à pressão seletiva imposta pelo sistema imune do hospedeiro. O uso de mutantes isogênicos deficientes em cápsula e/ou PspA permite isolar o efeito específico de cada fator de virulência, reduzindo interferências decorrentes da heterogeneidade genética entre cepas distintas.

Dessa forma, este estudo se justifica por investigar, de maneira integrada, como dois dos principais fatores de virulência do *Streptococcus pneumoniae* — a cápsula polissacarídica e a PspA — influenciam a resistência bacteriana frente a um dos mais importantes efetores da imunidade inata humana. Ao considerar diferentes sorotipos, mutantes isogênicos, a ação de uma defensina

fisiologicamente relevante e o papel de anticorpos específicos, este trabalho contribui para a identificação de fragilidades do patógeno que podem ser exploradas no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e estratégias imunológicas mais eficazes para o controle das infecções pneumocócicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente projeto tem como objetivo avaliar os efeitos da proteínas PspA e da presença da cápsula polissacarídica na ação da defensina HNP-I sobre o pneumococo.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar os efeitos do HNP em pneumococos de dois sorotipos capsulares diferentes;
- Comparar os efeitos do HNP em pneumococos selvagens e mutantes que não produzem cápsula;
- Avaliar os efeitos do tratamento com HNP em pneumococos selvagens e mutantes que não expressam a proteína PspA;
- Avaliar os efeitos da adição de PspA recombinante a ação do HNP.
- Avaliar os efeitos da adição de anticorpos anti-PspA na ação do HNP-I.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo do HNP-I

Para a realização dos ensaios bactericidas, foi utilizado peptídeo antimicrobiano humano HNP-I (Human Neutrophil Peptide-1), adquirido da empresa ANASPEC (código AS-60743), na forma liofilizada. A preparação do peptídeo seguiu rigoroso controle técnico para garantir sua estabilidade e preservação de atividade biológica. Inicialmente, o HNP-I foi reconstituído com ácido acético + albumina sérica bovina (BSA), preparado na concentração 100 µg/ml, conforme apresentado na figura 5.

Após a reconstituição, a solução foi submetida à homogeneização por leve agitação e posteriormente armazenada em freezer a -80 °C em alíquotas individuais, a fim de evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, os quais poderiam comprometer sua integridade estrutural e função biológica. Cada alíquota foi descongelada apenas no momento de uso, de acordo com a necessidade experimental.

3.2 Isolados bacterianos

Para a condução dos experimentos propostos, foram utilizados isolados bem caracterizados de *Streptococcus pneumoniae*, contemplando tanto cepas selvagens quanto variantes mutantes com alterações nos principais fatores de virulência, mantidos em estoque congelados a -80°C. Conforme os dados apresentados na tabela 1, as cepas selvagens utilizadas foram D39 (sorotipo capsular 2) e TIGR4 (sorotipo capsular 4), ambas amplamente descritas na literatura por suas características de virulência e estabilidade fenotípica em estudos laboratoriais. Os clados 2 e 4 de PspA diferem por pertencerem a famílias distintas e por apresentarem variações na região N-terminal da proteína, o que reflete em perfis antigênicos e imunológicos diferentes. Apesar de não estarem diretamente associados a sorotipos capsulares específicos, esses clados estão amplamente distribuídos entre isolados clinicamente relevantes de *Streptococcus pneumoniae*, evidenciando a diversidade genética da espécie. Essa heterogeneidade é biologicamente relevante, pois pode influenciar a interação do pneumococo com o sistema imune do hospedeiro e deve ser considerada no desenvolvimento de estratégias vacinais baseadas em PspA. Essas cepas serviram como base de comparação para análise do efeito da HNP-I frente aos diferentes contextos genéticos avaliados.

Além das cepas selvagens, foram incorporadas ao estudo cepas mutantes deficientes na expressão da proteína de superfície PspA: JY53 (mutante de D39) e BR61.1 (mutante de TIGR4), gentilmente cedidas pelo Dr. David Briles, da Universidade do Alabama (UAB). A proteína PspA é reconhecida por sua função protetora contra a deposição de complemento na superfície bacteriana, o que reforça a importância de sua exclusão para avaliação da ação direta da HNP-I. Ainda, foram incluídas cepas isogênicas que não expressam cápsula polissacarídica: AM1000 (mutante de D39) e HR1001 (mutante de TIGR4), fornecidas pelo Dr. Anders Hakansson, da Lund University (LU). A ausência de cápsula, principal elemento de evasão imune do pneumococo, permite uma avaliação mais direta do impacto estrutural na suscetibilidade à defensina.

TABELA 1. Cepas de *Streptococcus pneumoniae* utilizadas nesse estudo.

ISOLADO	Clado de PspA	SOROTIPO	ORIGEM	ESPECIFICAÇÕES
D39	2	2	UAB ¹	Selvagem
TIGR4	4	4	UAB ¹	Selvagem
JY53	—	2	UAB ¹	mutante de D39 sem PspA
BR61.1	—	4	UAB ¹	mutante de TIGR4 sem PspA
AM1000	2	—	LU ²	mutante isogênico de D39 sem cápsula
HR1001	4	—	LU ²	mutante isogênico de TIGR4 sem cápsula

¹ Universidade do Alabama; ² Lund University.

No dia anterior à realização de cada experimento, os isolados bacterianos mantidos em criopreservação foram descongelados lentamente em gelo, de forma a preservar a viabilidade e

integridade fisiológica das células. Conforme o esquema representado na figura 6, a partir de cada estoque, um volume de 20 μL da suspensão foi semeado em placa de ágar sangue, utilizando a técnica de esgotamento em estrias, método que permite a obtenção de colônias isoladas e facilita a padronização da população bacteriana empregada. A incubação foi realizada em estufa bacteriológica a 37 °C, durante 18 a 24 horas, em atmosfera anaeróbica obtida por meio de jarra de anaerobiose, garantindo condições adequadas para o crescimento do *S. pneumoniae*, cuja fisiologia é favorecida pela redução da pressão de oxigênio.

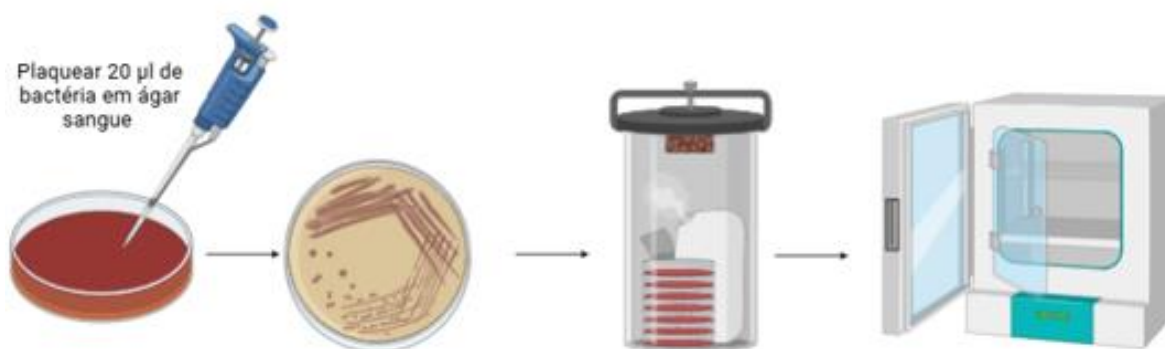


FIGURA 5. Cultivo Bacteriano. Fluxograma do preparo bacteriano: descongelamento dos isolados, plaqueamento em ágar sangue por esgotamento em estrias e incubação a 37 °C por 18–24 h em atmosfera anaeróbica. *Fonte: Acervo próprio, produzido através do BioRender, 2024.*

Na manhã seguinte, colônias isoladas, preferencialmente bem formadas e com morfologia característica, foram selecionadas com o auxílio de um swab estéril e transferidas para tubos contendo 5 mL de meio líquido Todd Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura (THY), um meio rico que favorece o crescimento rápido e sustentado do pneumococo. O pH da solução foi previamente ajustado para 4, valor levemente ácido que simula condições fisiológicas específicas e pode impactar na expressão de genes relacionados à virulência e à resposta a agentes antimicrobianos. A cultura foi incubada em estufa a 37 °C, sem agitação, durante aproximadamente três horas, período necessário para que as bactérias atinjam a fase exponencial de crescimento, indicada pela densidade óptica (D.O.) ajustada entre 0,3 e 0,4 a 600 nm, como representado na figura 7.

Esse intervalo de crescimento ativo é fundamental, uma vez que a susceptibilidade dos pneumococos à ação de peptídeos antimicrobianos como a HNP-I pode variar significativamente entre diferentes fases do ciclo bacteriano. A padronização do ponto de colheita permite minimizar variações técnicas e assegura que a população bacteriana submetida ao tratamento esteja em condições fisiológicas comparáveis entre os diferentes ensaios e isolados testados. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro devidamente calibrado, utilizando cubetas compatíveis com medições de absorbância no espectro de 600 nm, garantindo a precisão na estimativa da concentração celular.

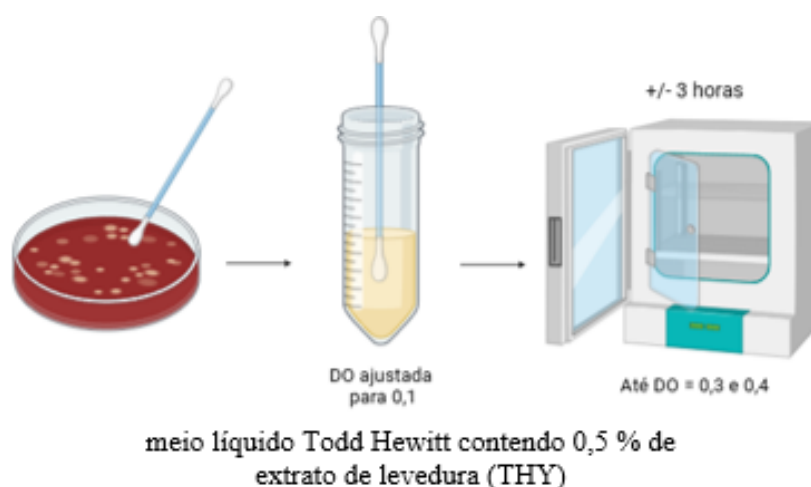


FIGURA 6. Esquema do preparo da cultura bacteriana para os ensaios. As colônias foram inoculadas em meio líquido Todd Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura (THY), com ajuste da densidade óptica inicial para $DO_{600} = 0,1$, seguido de incubação por aproximadamente 3 h até atingir DO_{600} entre 0,3 e 0,4. *Fonte: Acervo próprio, produzido através do BioRender, 2024.*

A partir desse ponto, as culturas ficam prontas para os procedimentos de lavagem, ressuspensão e exposição ao peptídeo, conforme os protocolos estabelecidos nas etapas seguintes da metodologia. HNP-I.

3.3 Ensaio bactericida

A suscetibilidade do *Streptococcus pneumoniae* à HNP-I foi avaliada utilizando um ensaio bactericida in vitro, conforme adaptação descrita por Waz et al, 2024. Após esse ponto, as culturas

foram submetidas a centrifugação em baixa rotação (geralmente entre 4.000 e 5.000 x g por 5 minutos), sendo o sobrenadante cuidadosamente descartado para evitar perda de células.

Conforme o esquema representativo da figura 8, os pellets bacterianos foram lavados duas vezes consecutivas com 1 ml de PBS e ressuspensos com um volume igual de tampão fosfato de sódio estéril 10 mM em pH 7, procedimento fundamental para a remoção de resíduos do meio de cultura e padronização do microambiente iônico antes da exposição ao peptídeo. A suspensão final foi padronizada em 1 mL do mesmo tampão, garantindo a homogeneidade na concentração celular em todos os grupos experimentais.

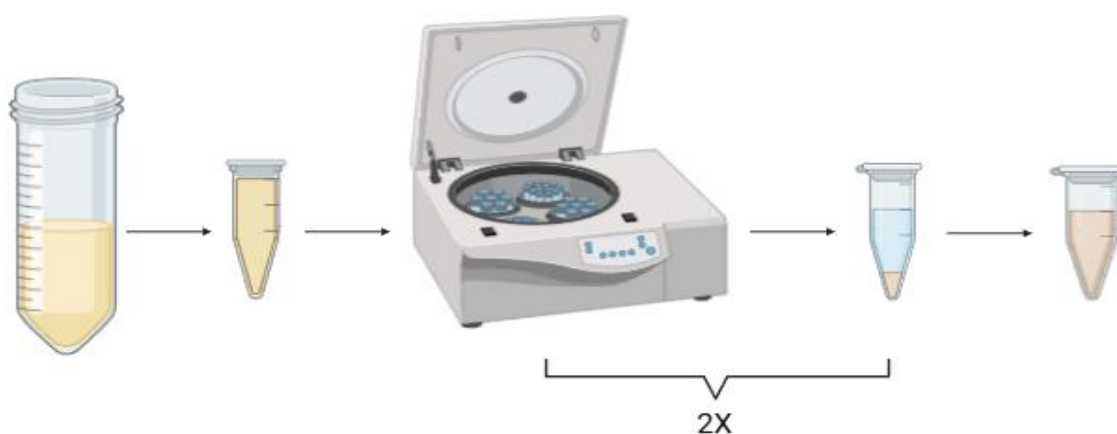


FIGURA 7. Esquema ilustrativo do preparo das amostras bacterianas para o ensaio de suscetibilidade ao peptídeo antimicrobiano HNP-I. As culturas de *Streptococcus pneumoniae* foram submetidas à centrifugação em baixa rotação, seguida do descarte do sobrenadante, duas lavagens consecutivas em PBS e ressuspensão em tampão fosfato de sódio estéril (10 mM, pH 7,0), com padronização do volume final para homogeneização da concentração celular antes da exposição ao peptídeo. *Fonte: Acervo próprio, produzido através do BioRender, 2024.*

Em seguida, alíquotas de 50 μ L da suspensão em tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7,6) foram distribuídas em tubos estéreis conforme mostrado na figura 9 e incubadas com diferentes concentrações do peptídeo HNP-1 (6,25; 12,5 e 25 μ g/mL), obtidas por diluição seriada, mantendo-se uma amostra sem adição do peptídeo como controle.



FIGURA 8. Esquema experimental da incubação de *Streptococcus pneumoniae* com diferentes concentrações do peptídeo antimicrobiano HNP-I. Aliquotas de 50 µL da suspensão bacteriana em tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7,6) foram distribuídas em tubos estéreis e incubadas com HNP-I nas concentrações finais de 25, 12,5, 6,25 e 3 µg/mL, obtidas por diluição seriada. Uma amostra sem adição do peptídeo foi utilizada como controle. Os círculos numerados representam os tubos de réplicas experimentais correspondentes a cada condição. *Fonte: Acervo próprio, produzido através do BioRender, 2024.*

A seguir, foi acrescentado 50 µL da solução bacteriana diluída em tampão em cada tubo, inclusive os controles. A incubação foi realizada a 37 °C por 60 minutos, sem agitação, para permitir a interação direta entre o peptídeo e a superfície bacteriana. Logo após esse período, as

amostras foram plaqueadas em ágar sangue, utilizando a técnica de diluição em série em uma placa de 96 poços.

Foi adicionado 90 μL de PBS estéril em 60 poços, distribuídos em 10 colunas (1 a 10) e 6 linhas (A, B, C, D, E e F), cada coluna referente a um tubo de solução bacteriana após incubação. Em seguida, foi acrescido 10 μL da amostra no poço da primeira linha, homogeneizando pelo menos dez vezes e transferindo o mesmo volume, 10 μL , para a linha seguinte, assim por diante até a sexta linha, após a última diluição, 10 μL da solução é descartada. O mesmo processo é realizado em cada coluna, com suas respectivas amostras, em duplicadas de diferentes diluições conforme mostrado na figura 10.

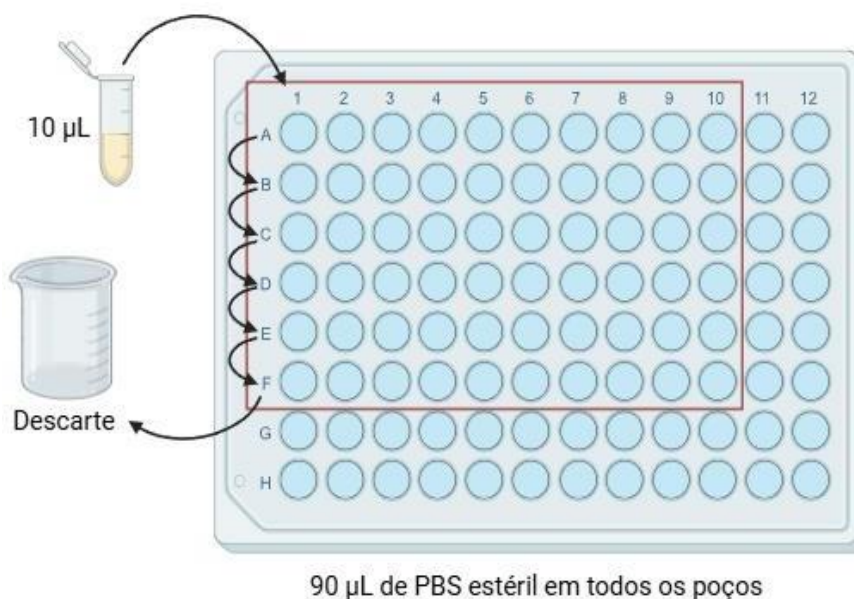


FIGURA 9. Representação esquemática da diluição em série em placa de 96 poços. A figura ilustra a transferência sequencial de volumes entre os poços, demonstrando o processo de diluição para reduzir progressivamente a concentração da solução em potências de 10. *Fonte: autoria própria, elaborada no BioRender, 2024.*

Por fim, as alíquotas nas diluições 3,4,5 e 6 de cada duplicata (colunas) foram plaqueadas em ágar sangue e incubadas por 16 horas a 37 °C, em jarra de anaerobiose, como visto na figura 11. A quantificação do efeito bactericida foi realizada por contagem direta das unidades formadoras de colônia (UFC), comparando os grupos tratados com HNP-I aos controles, que foram incubados apenas com tampão fosfato de sódio. Para isso, o número de UFC/mL do grupo tratado com HNP-

1 foi comparado ao do grupo controle não tratado, considerado como 100% de sobrevivência. A porcentagem de redução foi obtida calculando-se a diferença entre o valor do controle e a razão entre as UFCs do grupo tratado e do controle, expressa em porcentagem.

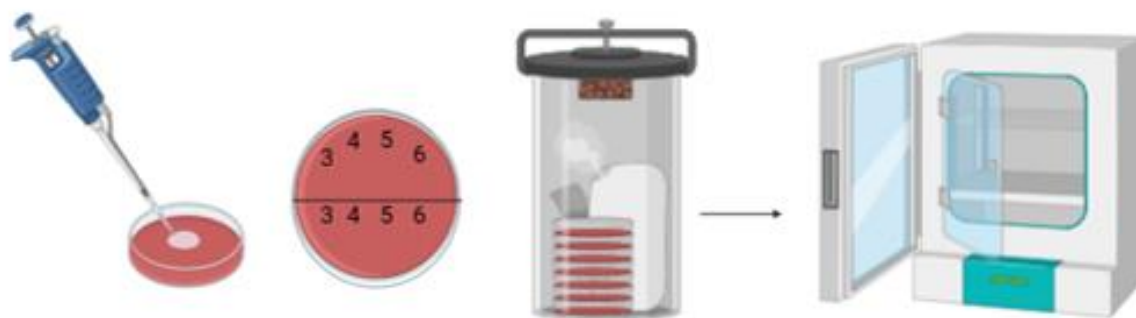


FIGURA 10. Esquema do plaqueamento das amostras. Plaqueamento em ágar sangue e incubação por 16 h a 37 °C, em jarra de anaerobiose, seguido da quantificação do efeito bactericida por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). *Fonte: autoria própria, elaborada no BioRender, 2024.*

3.4 Efeito da adição de rPspA

A PspA recombinante foi obtida a partir de fragmentos gênicos derivados da cepa P94 de *Streptococcus pneumoniae*, pertencente à família 1, clado 2. As regiões correspondentes ao domínio alfa-helicoidal N-terminal e ao domínio rico em prolina foram amplificadas a partir do DNA cromossômico e clonadas no vetor de expressão pAE-6xHis. O plasmídeo recombinante foi utilizado para transformar células de *Escherichia coli* BL21(DE3), nas quais a expressão da proteína foi induzida por adição de IPTG, sob condições controladas de crescimento. Após a indução, as células foram coletadas, lisadas e a PspA recombinante foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel, explorando a cauda de histidina, conforme protocolo previamente descrito por CONVERSO et al., 2017.

Para investigar o possível efeito protetor da proteína PspA recombinante (rPspA) sobre a ação da alfa-defensina HNP-I, foi realizado um experimento adicional conforme descrito por WAZ et al., 2020. Um fragmento recombinante da região N-terminal de PspA (rPspA94), foi incubado

com 25 µg de HNP-I por 15 min a 37 °C para permitir a interação rPspA-peptídeo. Como controle, foi utilizada a proteína BSA nas mesmas condições.

A mistura peptídeo HNP-I + rPspA ou HNP-I + BSA foi adicionada à suspensão bacteriana da cepa selvagem D39 (sorotipo 2), nas mesmas condições descritas no ensaio bactericida, finalizando com o plaqueamento. A análise comparativa entre grupos tratados com e sem rPspA foi realizada após contagem das bactérias sobreviventes em cada grupo. Os experimentos foram realizados em quadruplicata; as diferenças foram avaliadas por t de Student.

Essa etapa foi realizada pela aluna Maria Eduarda Pereira Mendes.

3.5 Efeito da adição de anticorpos anti-PspA

Buscando aprofundar a compreensão da interação entre imunidade adaptativa e ação da HNP-I, foi conduzido um ensaio de pré-opsonização com anticorpos específicos anti-PspA. Os pneumococos foram incubados por 15 min a 37 °C com soro de camundongos BALB/c previamente imunizados por via subcutânea com três doses consecutivas de 10 µg de rPspA, em intervalos de 10 dias, utilizando hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] como adjuvante. Os soros foram obtidos em experimentos anteriores, em conformidade com as diretrizes éticas institucionais e após aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa com Uso de Animais da Universidade São Francisco (protocolos V2.005.05.2022 e 001.06.2019), conforme mostrado no Anexo I - Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa e Anexo II - Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), garantindo conformidade com as normas de bem-estar animal.

Após a última imunização, amostras de sangue foram coletadas por punção retro-orbitária sob anestesia local, e os soros obtidos por centrifugação foram armazenados a -20 °C até o uso. A concentração de IgG específica anti-PspA foi previamente quantificada por ELISA, permitindo a padronização dos soros para títulos equivalentes antes dos experimentos. O grupo controle recebeu soro de animais expostos apenas ao adjuvante Al(OH)₃. Após a pré-opsonização, as bactérias foram lavadas em tampão fosfato para remoção de anticorpos não ligados e, então, expostas à HNP-I (25 µg) no ensaio bactericida, seguindo-se o plaqueamento. Cada condição foi realizada em quadruplicata; a análise estatística foi feita por teste t de Student.

Essa etapa foi realizada pela aluna Maria Eduarda Pereira Mendes.

3.6 Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios experimentais foram submetidos a análise estatística com o objetivo de verificar a significância das diferenças observadas entre os grupos tratados com diferentes concentrações de HNP-I e seus respectivos controles. Para as comparações entre as cepas (selvagem *vs.* mutante sem PspA) e (selvagem *vs.* mutante sem capsula) ao longo das concentrações, utilizou-se ANOVA bidirecional, porque o desenho inclui dois fatores experimentais — cepa e concentração de HNP-I — e interessa testar não só os efeitos principais de cada fator (se as cepas diferem em média e se há efeito de dose), mas também a interação cepa×dose (se a diferença entre cepas muda conforme a concentração). Após detectar efeitos no modelo, aplicou-se o pós-teste de Sidak para realizar comparações pareadas entre cepas dentro de cada concentração, controlando o erro do tipo I decorrente de múltiplas comparações (rejeitar a hipótese nula quando ela pode ser verdadeira, “falso positivo”).

Para os experimentos que avaliaram o efeito da adição de anticorpos anti-PspA e o efeito da adição de PspA recombinante, utilizou-se o teste t de Student bicaudal por se tratar de comparações simples entre dois grupos independentes (tratado *vs.* controle) em um único fator, o que o torna o procedimento mais direto e com maior poder sob os pressupostos de normalidade e variâncias semelhantes. Adotou-se $p \leq 0,05$ como critério de significância estatística em relação ao respectivo controle.

As análises e representações gráficas foram realizadas no GraphPad Prism 8, com apresentação dos resultados em figuras de barras, como média $\pm$ SEM, com indicação da significância estatística nas figuras; os dados brutos foram organizados em planilhas para assegurar rastreabilidade e reprodutibilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito da cápsula sobre a ação bactericida do HNP-I sobre o pneumococo

A cápsula polissacarídica do *Streptococcus pneumoniae* apresenta variações significativas na composição entre diferentes sorotipos, o que pode impactar diretamente a sensibilidade à ação de peptídeos antimicrobianos, como a defensina humana HNP-I. A comparação entre as cepas D39 e TIGR4 evidencia que diferenças capsulares e genéticas associadas a esses sorotipos podem explicar, ao menos em parte, as diferentes respostas após exposição ao HNP-I observadas experimentalmente. Sendo assim, foi comparada a sensibilidade entre cepas selvagens de diferentes sorotipos (D39/TIGR4) nas mesmas condições conforme apresentado no gráfico da figura 12.

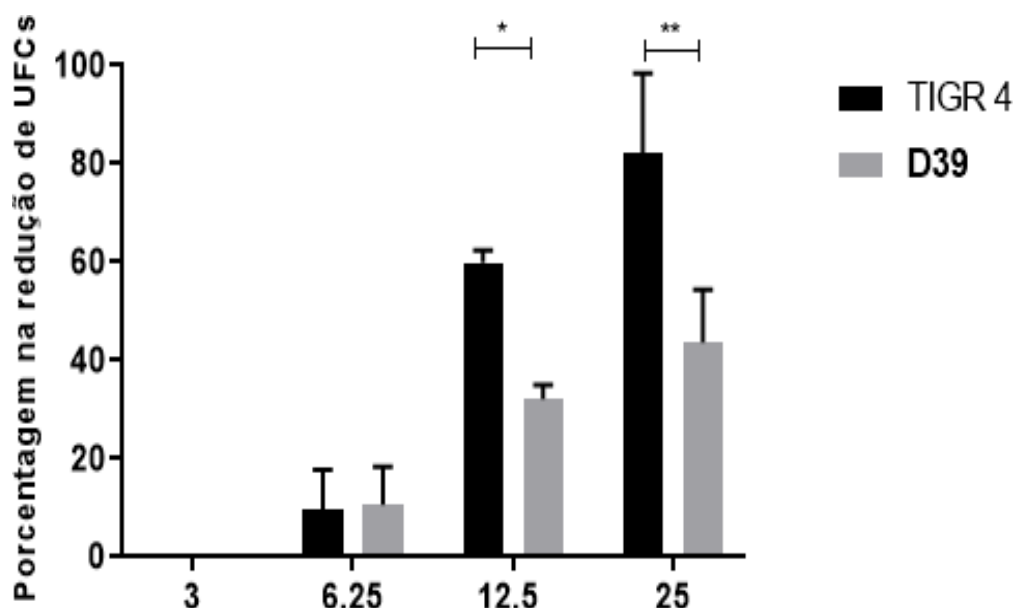


FIGURA 11. Comparação da sensibilidade ao HNP-I entre cepas encapsuladas de diferentes sorotipos (TIGR4 e D39). Redução percentual de UFCs em *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 e D39 foram avaliadas após tratamento com diferentes concentrações de HNP-I. As bactérias foram tratadas com 3, 6,25, 12,5 e 25 µg/mL de HNP-I, e a sobrevivência foi comparada entre os grupos utilizando ANOVA de duas vias com pós-teste de Sidak. Comparação entre a cepa encapsulada de sorotipo 4 (TIGR4) e a cepa encapsulada de sorotipo 2 (D39). $p < 0,05$; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ ao comparar diferentes bactérias tratadas com a mesma concentração de HNP-I.

Os dados do gráfico da figura 12 demonstram que a sensibilidade ao HNP-I varia entre as cepas encapsuladas de *Streptococcus pneumoniae*, sendo mais expressivo na TIGR4 em comparação à D39, especialmente nas maiores concentrações do peptídeo. Observa-se um efeito dose-dependente em ambas as cepas, com redução progressiva da viabilidade bacteriana à medida que a concentração de HNP-I aumenta, porém significativamente maior para o sorotipo 4. Esses resultados reforçam que diferenças estruturais e composicionais da cápsula influenciam a susceptibilidade do pneumococo aos peptídeos antimicrobianos humanos.

Para avaliar o papel da ausência da cápsula na resistência bacteriana ao HNP-I, foram comparadas cepas encapsuladas e suas variantes isogênicas não encapsuladas, sendo TIGR4 (sorotipo 4) e seu mutante HR1001, D39 (sorotipo 2) e seu mutante AM1000.

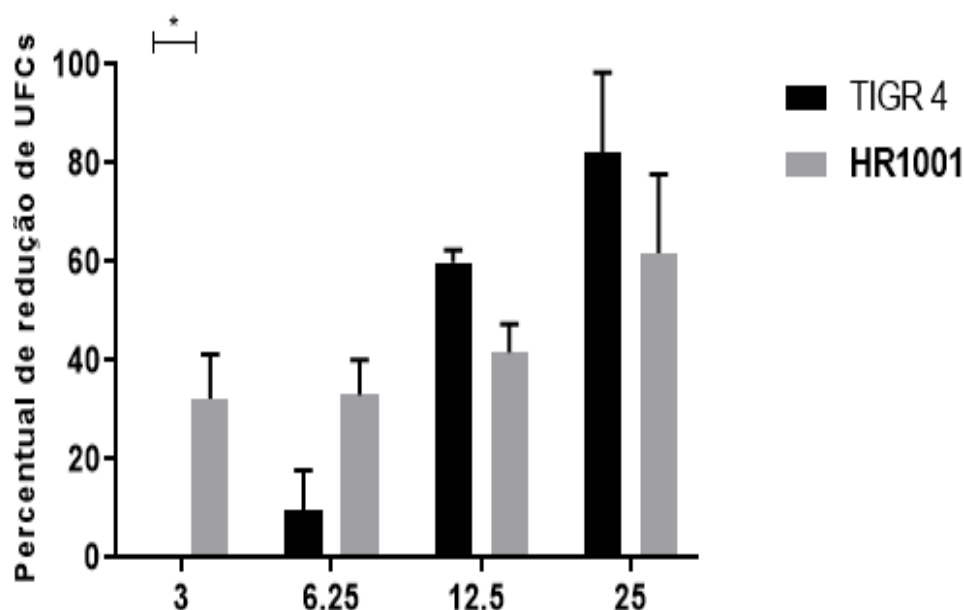


FIGURA 12. Efeito da ausência da cápsula na sensibilidade de *Streptococcus pneumoniae* ao HNP-I. As bactérias foram tratadas com concentrações crescentes do peptídeo antimicrobiano (3, 6,25, 12,5 e 25 µg/mL) para mensurar a taxa de redução de sobrevivência. A comparação entre grupos foi realizada utilizando ANOVA de duas vias com pós-teste de Sidak. Cada barra representa a porcentagem de redução de UFC em relação aos controles não tratados. Comparação entre a cepa encapsulada de sorotipo 4 (TIGR4) e seu mutante isogênico não encapsulado (HR1001). $p < 0,05$; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ ao comparar diferentes bactérias tratadas com a mesma concentração de HNP-I.

De acordo com a figura 13, observou-se um efeito dose-dependente do HNP-I sobre a suscetibilidade do *S. pneumoniae*. O percentual de redução de UFCs aumenta progressivamente à medida que a concentração do peptídeo também é maior em ambas as linhagens. Notavelmente, a cepa TIGR4 mostrou porcentagens de redução mais alta comparada a mutante isogênica não encapsulado HR1001 em todas as doses. Em 3 µg/mL, a inibição ainda é limitada para ambas as cepas; no entanto foi a única concentração que demonstrou diferença significativa entre TIGR4 e HR1001 na mesma dose. Entre 6,25 e 12,5 µg/mL observa-se aumento consistente da atividade bactericida, mais evidente na TIGR4; e, em 25 µg/mL, a TIGR4 atinge a maior redução percentual. Nas condições avaliadas, a ausência da cápsula em HR1001 não aumentou significativamente a sensibilidade ao HNP-I, os dados indicam que o efeito protetor da cápsula não é dominante em todo o intervalo testado, ou seja, não se mantém consistente.

Os resultados demonstram que o HNP-I exerce um efeito bactericida claramente dose-dependente sobre *Streptococcus pneumoniae*. Entretanto, de forma consistente ao longo das concentrações testadas, a ausência da cápsula polissacarídica não resultou em aumento significativo da sensibilidade ao peptídeo, uma vez que a linhagem encapsulada TIGR4 apresentou, em geral, maior redução de UFCs do que a mutante não encapsulada HR1001. A diferença significativa observada apenas na menor concentração sugere que o papel protetor da cápsula frente ao HNP-I é limitado e dependente da dose, não se mantendo como um fator dominante de resistência em concentrações mais elevadas do peptídeo. Esses achados indicam que outros componentes da superfície bacteriana, além da cápsula, provavelmente contribuem de forma mais relevante para a modulação da suscetibilidade do pneumococo ao HNP-I.

No experimento seguinte foram comparadas a cepa selvagem D39 com sua mutante não-encapsulada AM1000, a figura 14 a seguir desmonstra o efeito dose-dependente do HNP-I sobre a viabilidade de *Streptococcus pneumoniae*. À medida que a concentração do peptídeo foi elevada de 3 para 25 µg/mL, o percentual de redução de UFCs aumentou em ambas as cepas, porém, diferentemente do efeito observado na TIGR4 e sua mutante não encapsulada, agora os ensaios demonstraram uma resposta de suscetibilidade acentuadamente superior na cepa não capsulada AM1000 em comparação à selvagem D39. Em 6,25 µg/mL, AM1000 já exibiu queda expressiva de sobrevivência, aproximando-se de redução quase completa nas concentrações de 12,5 e 25 µg/mL, enquanto D39 apresentou diminuições progressivas porém menores nas mesmas condições. As diferenças entre as cepas tornaram-se estatisticamente significativas a

partir de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, indicando que nessas condições a presença da cápsula conferiu proteção relevante frente à atividade bactericida do HNP-I.

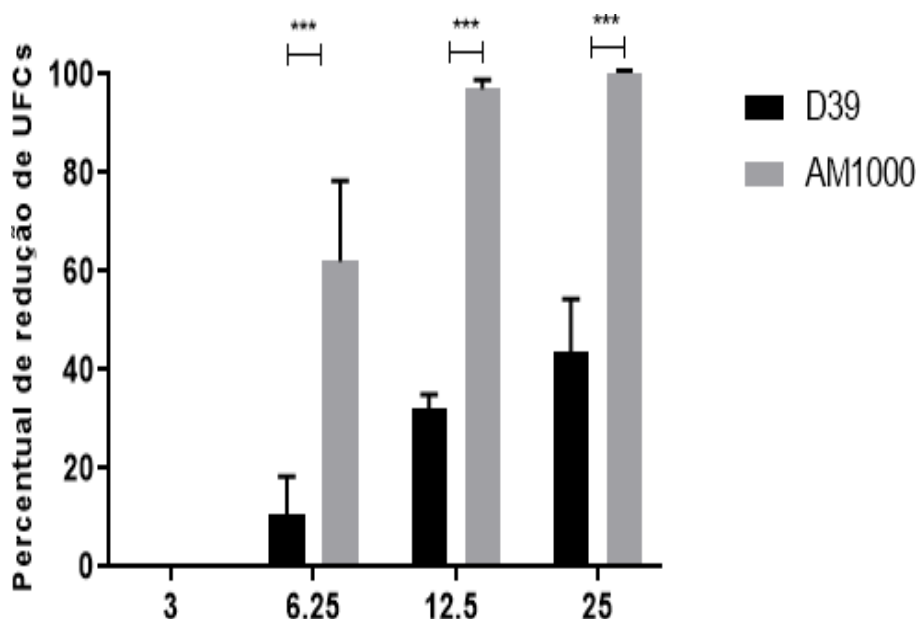


FIGURA 13. Efeito da ausência da cápsula na sensibilidade de *Streptococcus pneumoniae* ao HNP-I. As bactérias foram tratadas com concentrações crescentes do peptídeo antimicrobiano (3, 6,25, 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$) para mensurar a taxa de redução de sobrevivência. A comparação entre grupos foi realizada utilizando ANOVA de duas vias com pós-teste de Sidak. Cada barra representa a porcentagem de redução de UFC em relação aos controles não tratados. Comparação entre a cepa encapsulada de sorotipo 2 (D39) e seu mutante isogênico não encapsulado (AM1000). $p < 0,05$; $*p < 0,01$; $**p < 0,001$ ao comparar diferentes bactérias tratadas com a mesma concentração de HNP-I.

Em síntese, os resultados mostram que o HNP-I promove redução progressiva da viabilidade de *Streptococcus pneumoniae* conforme o aumento da concentração do peptídeo. A comparação entre D39 e AM1000 evidencia que a ausência da cápsula polissacarídica está associada a maior suscetibilidade ao HNP-I, com diferenças significativas observadas a partir de 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

4.2. Efeito da proteína PspA na ação bactericida do HNP-I sobre pneumococo.

Para avaliar o papel da proteína de superfície PspA na resistência de *Streptococcus pneumoniae* à ação do peptídeo antimicrobiano HNP-I, foram comparadas cepas selvagens de

diferentes sorotipos (D39 e TIGR4) com seus respectivos mutantes isogênicos negativos para a expressão da proteína PspA (JY53 e BR61.1). Para isso, as bactérias foram tratadas com concentrações crescentes de HNP-I, e a atividade antimicrobiana foi avaliada por meio da porcentagem de redução na viabilidade bacteriana, em comparação ao grupo controle tratado apenas com solução tampão.

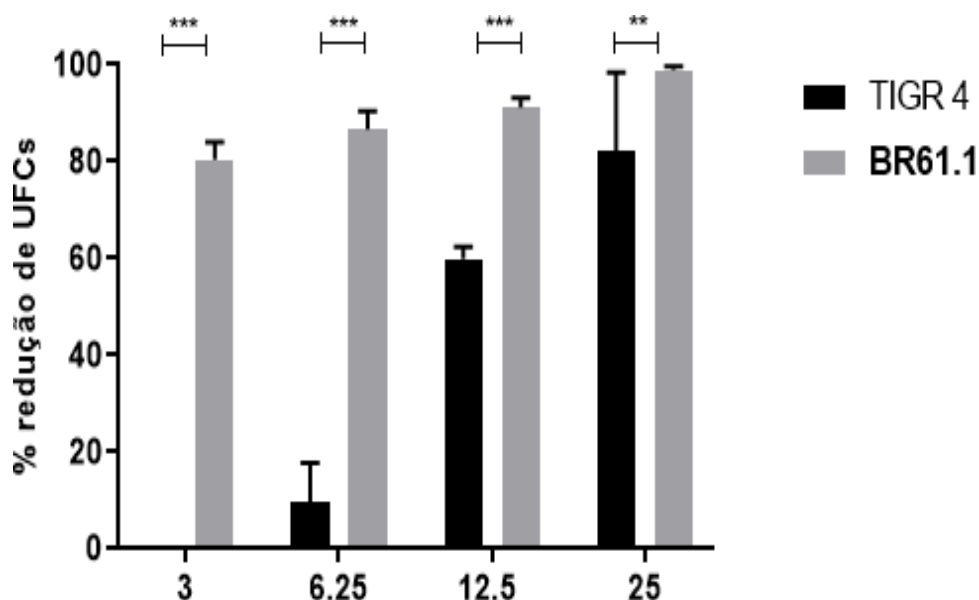


FIGURA 14. Redução de UFCs em cepas de *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 e BR61.1 tratadas com concentrações crescentes de HNP-I. As bactérias foram tratadas com 3, 6,25, 12,5 e 25 µg/mL de peptídeo antimicrobiano HNP-I (3, 6,25, 12,5 e 25 µg/mL), e a sobrevivência foi comparada entre os grupos utilizando ANOVA de duas vias com pós-teste de Sidak. Cada barra representa a porcentagem de redução de UFC em relação aos controles não tratados. Comparação entre a cepa selvagem de sorotipo 4 (TIGR4) e seu mutante isogênico sem PspA (BR61.1). $p < 0,05$; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ ao comparar diferentes bactérias tratadas com a mesma concentração de HNP-I.

Os resultados, ilustrados no figura 15, demonstram a comparação entre as cepas TIGR4 (selvagem) e BR61.1 (mutante negativa para a expressão de PspA), observou-se um efeito dose- dependente do HNP-I sobre a viabilidade bacteriana com aumento progressivo da porcentagem de redução de UFCs conforme a concentração do peptídeo aumentava, ou seja, quanto maior a concentração do peptídeo maior foi o seu efeito bactericida. Em todas as concentrações testadas, a cepa mutante BR61.1, negativa para PspA, apresentou maior

susceptibilidade à ação do HNP-I em comparação à cepa selvagem TIGR4. Mesmo na menor concentração testada (3 $\mu\text{g/mL}$), a cepa isenta de PspA já apresentou taxas de inibição superiores a 80%, enquanto a cepa selvagem não demonstrou resultado significativo na mesma condição. Demonstrando que a ausência da proteína de superfície PspA tornou o pneumococo mais sensível à ação do peptídeo.

A comparação entre TIGR4 e a mutante BR61.1 evidencia que a ausência da proteína de superfície PspA está associada a aumento consistente da suscetibilidade ao HNP-I em todas as concentrações avaliadas. Esses dados indicam que a PspA exerce papel relevante na proteção do pneumococo à ação bactericida do peptídeo.

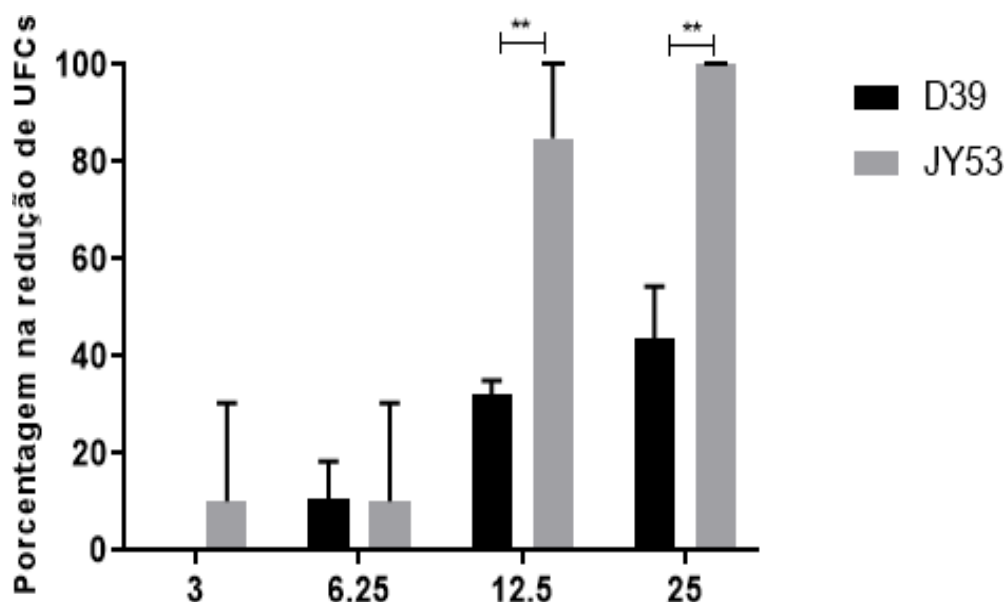


FIGURA 15. Redução de UFCs em cepas de *Streptococcus pneumoniae* D39 e JY53 tratadas com concentrações crescentes de HNP-I. As bactérias foram tratadas com concentrações crescentes do peptídeo antimicrobiano (3, 6,25, 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$), e a sobrevivência foi comparada entre os grupos utilizando ANOVA de duas vias com pós-teste de Sidak. Cada barra representa a porcentagem de redução de UFC em relação aos controles não tratados. Comparação entre a cepa selvagem de sorotipo 2 (D39) e seu mutante isogênico sem PspA (JY53). $p < 0,05$; * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ ao comparar diferentes bactérias tratadas com a mesma concentração de HNP-I.

De acordo com o figura 16, observa-se que o tratamento com o HNP-I resultou em redução

percentual de UFCs nas cepas D39 e JY53 de modo dose-dependente. Em todas as concentrações testadas, a cepa JY53 (mutante sem PspA) apresentou maior susceptibilidade ao HNP-I em comparação à D39 (selvagem). Nas doses mais baixas, 3 e 6,25 µg/mL, observaram-se reduções discretas em ambas as cepas; já em 12,5 µg/mL e 25 µg/mL a cepa JY53 apresentou uma redução acentuada da viabilidade, aproximando-se de 90–100% na maior dose, enquanto D39 permaneceu com redução modesta na mesma condição. A comparação evidenciou interação significativa entre cepa e concentração e diferenças entre D39 e JY53, principalmente nas maiores concentrações (12,5 e 25 µg/mL).

A resposta das cepas ao HNP-I não foi homogênea ao longo das concentrações avaliadas, com divergências mais pronunciadas nas doses mais elevadas. Esse comportamento indica que características específicas da superfície bacteriana influenciam na redução de viabilidade observada nessas condições.

4.3. Efeito da adição rPspA livre na ação de HNP sobre o pneumococo

Para avaliar se a adição de PspA recombinante poderia interferir na ação bactericida de *HNP-I* sobre pneumococos selvagens, a cepa *TIGR4* foi tratada com diferentes concentrações do peptídeo antimicrobiano, na presença ou ausência de rPspA 94. A proteína recombinante utilizada (rPspA 94) corresponde à porção N-terminal de uma PspA de clado 2 (família 1), sendo previamente descrita como um fator de virulência capaz de modular a interação da bactéria com o sistema imune.

Os dados da figura 17 indicam que a pré-incubação do HNP-I com o fragmento recombinante N-terminal de PspA (rPspA94) aumentou significativamente a sobrevivência do pneumococo D39 em relação ao controle em que o peptídeo foi incubado com BSA. Isso se observa pelo valor de UFC/mL mais alto no grupo rPspA94 e pelo asterisco indicando diferença estatística. Em termos biológicos, o resultado é consistente com um efeito protetor da PspA sobre a ação bactericida do HNP-I, provavelmente por sequestrar/neutralizar o peptídeo catiônico durante a pré-incubação e, assim, reduzir sua disponibilidade efetiva para atingir a bactéria. Em resumo, nas condições testadas (25 µg/mL de HNP-I), a presença de rPspA94 atenuou o efeito antimicrobiano do HNP-I e favoreceu a sobrevivência de um maior número de bactérias.

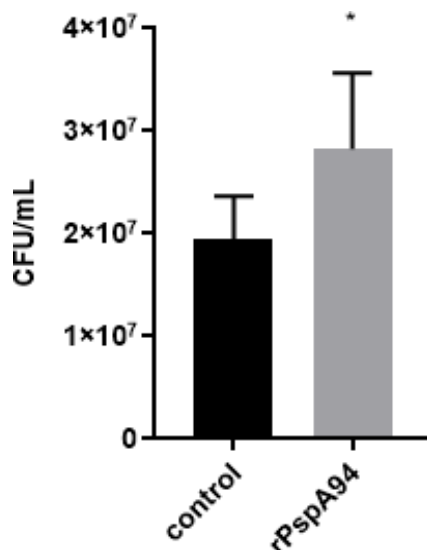


FIGURA 16. Efeito da adição de *PspA* recombinante na sobrevivência de *Streptococcus pneumoniae* D39 tratada com *HNP-I*. As bactérias foram tratadas com 25 µg/mL de HNP-I previamente incubada com um fragmento recombinante N-terminal de PspA (rPspA). O grupo controle foi incubado com HNP-I e BSA. Cada barra representa o número de bactérias sobreviventes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. $p < 0,05$ em comparação com o controle.

A presença do fragmento recombinante de PspA modificou a resposta do pneumococo ao HNP-I, resultando em maior número de bactérias viáveis em comparação ao controle. Esse achado indica que a interação direta entre o peptídeo antimicrobiano e componentes de superfície pode interferir na eficácia da atividade bactericida.

4.4. Efeito da adição de anticorpos anti-PspA na ação de HNP sobre o pneumococo

Para investigar se a adição de anticorpos específicos anti-PspA influenciariam na intensidade da ação do HNP-I, consequentemente na eliminação de pneumococos, culturas foram incubadas com soro controle ou com soro enriquecido em anticorpos anti-PspA e, em seguida, quantificadas.

Os dados apresentados no figura 18 abaixo mostram que a opsonização prévia do HNP-I com soro imune anti-PspA potencializou a atividade bactericida do peptídeo contra *S. pneumoniae*. No grupo controle (HNP-I + soro de animais apenas com adjuvante) a contagem de sobreviventes ficou em torno de $8-9 \times 10^8$ CFU/mL, enquanto no grupo com anticorpos anti-PspA a sobrevivência caiu para $3-4 \times 10^8$ CFU/mL, uma redução em torno de 60%. Essa

diferença foi estatisticamente significativa, o que indica que os anticorpos específicos para a PspA removem/neutralizam o efeito protetor dessa proteína de superfície, facilitando a ação do HNP-I, resultando em menor número de bactérias viáveis.

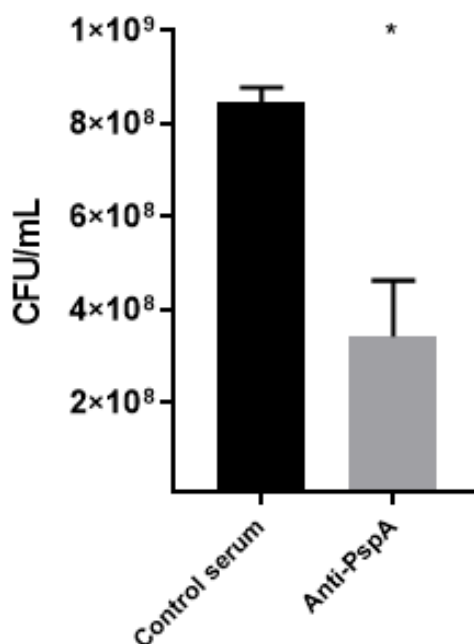


FIGURA 17. Efeito da adição de anticorpos anti-PspA na ação bactericida de HNP-I sobre *Streptococcus pneumoniae*. As bactérias foram tratadas com HNP-I previamente opsonizados com 5% de soro de camundongos imunizados com rPspA2, na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$. O grupo controle foi incubado com soro de camundongos injetados com adjuvante diluído em solução salina e HNP-I. Cada barra representa o número de bactérias sobreviventes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student. $p < 0,05$ em comparação com o soro controle.

A presença de anticorpos anti-PspA altera de forma significativa a resposta do pneumococo ao HNP-I, resultando em menor número de bactérias viáveis. Esse achado indica que a interação entre o peptídeo antimicrobiano e componentes da superfície bacteriana pode ser modulada por fatores humorais, influenciando a eficácia da atividade bactericida observada.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a ação do peptídeo antimicrobiano humano HNP-I sobre o *Streptococcus pneumoniae* é modulada por múltiplos fatores de virulência, cujos efeitos variam de acordo com o contexto genético e estrutural das cepas analisadas.

Apesar das diversas descrições sobre os vários mecanismos de proteção que a cápsula pode exercer sobre o pneumococo, os estudos mais recentes evidenciam que a cápsula polissacarídica exerce papel variável na resistência do *Streptococcus pneumoniae*. A análise comparativa entre cepas encapsuladas e suas variantes isogênicas não encapsuladas demonstrou que o impacto da cápsula não é uniforme entre diferentes sorotipos, sugerindo que fatores estruturais específicos e o contexto genético de cada linhagem influenciam o grau de proteção (YOTHER, 2011; WAZ et al., 2022).

A comparação direta entre as cepas encapsuladas TIGR4 e D39 reforça a hipótese de que a proteção conferida pela cápsula depende fortemente da natureza química do polissacarídeo capsular. Embora ambas apresentem redução progressiva da viabilidade bacteriana com o aumento da concentração de HNP-I, a resposta não foi homogênea entre os sorotipos. Enquanto a cápsula do sorotipo 2 parece limitar de forma eficaz a difusão do peptídeo, a do sorotipo 4 pode não oferecer a mesma repulsão eletrostática ou espessura suficiente para impedir a interação do HNP-I com a superfície bacteriana. Esse comportamento sugere que características específicas associadas a cada linhagem, incluindo a organização da superfície bacteriana e a composição capsular, influenciam a interação com a defensina. Tais diferenças estão em concordância com estudos que descrevem variações sorotipo-dependentes na susceptibilidade a peptídeos antimicrobianos, reforçando que a resposta do pneumococo ao HNP-I não pode ser considerada uniforme entre diferentes cepas, e que o efeito protetor da cápsula não é universal, mas dependente da estrutura molecular específica de cada tipo capsular.

Além disso, a comparação das cepas destaca a eficácia da cápsula como mecanismo de resistência aos peptídeos antimicrobianos está associada a propriedades específicas de cada tipo capsular, como densidade de carga, grau de hidratação e organização tridimensional. Além disso, evidências da literatura indicam que a cápsula pneumocócica não constitui uma estrutura estática, podendo ser modulada dinamicamente em resposta a estímulos do hospedeiro, o que sugere um papel adaptativo dessa estrutura durante diferentes estágios da infecção.

Um estudo de KIETZMAN et al. (2016) evidenciou que o *Streptococcus pneumoniae* consegue regular de forma dinâmica sua cápsula polissacarídica em resposta ao contato com o epitélio e com peptídeos antimicrobianos humanos (como LL-37). Os resultados demonstraram que a enzima LytA, principal autolisina do pneumococo, é responsável pelo “desprendimento” (*shedding*) parcial da cápsula, sem causar lise celular. Esse processo reduz temporariamente a espessura da cápsula, aumentando a capacidade de adesão e invasão epitelial, mas preservando a sobrevivência bacteriana. Assim, a cápsula do pneumococo não é uma estrutura estática de proteção, mas um elemento regulável que permite à bactéria alternar entre formas mais invasivas ou mais resistentes, dependendo do ambiente.

Na cepa TIGR4 (sorotipo 4) e seu mutante não encapsulado HR1001, observou-se comportamento atípico, em que a cepa encapsulada apresentou, de modo geral, maior suscetibilidade ao HNP-I, em especial nas concentrações mais altas. Esse efeito indica que, para o sorotipo 4, a cápsula não atua como barreira física efetiva contra a ação do peptídeo e, possivelmente, sua composição química, rica em resíduos carregados negativamente, possa até favorecer interações eletrostáticas com o HNP-I, facilitando sua aproximação à superfície bacteriana. A ausência de diferença significativa em altas concentrações sugere que o efeito protetor da cápsula, se presente, é facilmente superado quando o peptídeo alcança capazes de eliminar as bactérias.

Em contraste, o comportamento observado na cepa D39 (sorotipo 2) e sua derivada AM1000 evidencia um cenário diferente. Nessa comparação, a ausência de cápsula resultou em sensibilidade evidentemente aumentada, com reduções quase completas na viabilidade bacteriana em concentrações acima de 12,5 µg/mL. Esses dados confirmam que, para o sorotipo 2, a cápsula atua como uma barreira efetiva contra o ataque do HNP-I, atenuando sua capacidade de penetrar a parede celular e alcançar a membrana citoplasmática. Essa divergência entre os sorotipos vai de encontro com os estudos prévios que destacam variações substanciais na densidade de carga, composição de monossacarídeos e grau de hidratação das cápsulas pneumocócicas como determinantes críticos de sua eficácia protetora.

Ao trazer a análise pontual da cápsula e da PspA, os dados apresentados reforçam a visão de que a virulência do pneumococo vem da cooperação entre seus determinantes estruturais e funcionais, e não de um único mecanismo isolado. A análise comparativa entre os fatores de

virulência avaliados sugere que a PspA apresenta um padrão de patogenicidade mais consistente. Enquanto o efeito protetor da cápsula frente a peptídeos antimicrobianos, mostrou-se altamente sorotipo-dependente, variando conforme a composição, espessura e carga elétrica do polissacarídeo capsular, a ação da PspA sobre a superfície bacteriana parece atuar de forma mais uniforme entre as viriadas cepas. Essa estabilidade se deve à sua localização exposta e à conservação estrutural das regiões N-terminais entre diferentes variantes de *S. pneumoniae*, o que a torna um antígeno-alvo ideal para abordagens imunoterápicas e vacinais.

De modo geral, tanto a PspA quanto a cápsula atuam como mecanismos de defesa complementares, cada qual com vantagens biológicas específicas. A cápsula contribui para a resistência inicial frente a moléculas antimicrobianas e à fagocitose, enquanto a PspA atua em estágios mais dinâmicos da infecção, modulando a interação com o sistema imune inato e adaptativo. A compreensão integrada desses fatores reforça que a inibição simultânea de ambos — por exemplo, por meio de vacinas multialvo ou imunoterapias combinadas — pode representar uma estratégia de controle mais eficaz e duradoura contra o *S. pneumoniae* em comparação a abordagens centradas exclusivamente em um único fator de virulência.

A proteína de superfície PspA exerce um papel protetor significativo frente à ação do peptídeo antimicrobiano humano HNP-I. A exposição das cepas selvagens TIGR4 (sorotipo 4) e D39 (sorotipo 2) e de seus respectivos mutantes isogênicos ausentes de PspA (BR61.1 e JY53) a concentrações crescentes de HNP-I revelou um padrão de resposta dose-dependente, mesmo em contexto genético e capsular diferente, ambos apresentaram redução progressiva da viabilidade bacteriana conforme o aumento da concentração do peptídeo. Observa-se que, nas maiores concentrações, a ausência da PspA resultou em inibição superior a 80% da viabilidade bacteriana, independente do sorotipo capsular. No entanto, comparando as duas cepas a diferença entre a D39 e sua mutante sem PspA foi ainda mais expressiva, demonstrando que a variabilidade genética e estrutural entre os sorotipos pode influenciar na capacidade da PspA de proteger o pneumoco. A análise estatística indicou interação significativa entre os fatores “cepa” e “concentração”, evidenciando que o efeito do peptídeo é amplificado na ausência de PspA e que essa proteína modula diretamente a intensidade da resposta bacteriana.

Em conjunto, os achados sugerem a relevância da PspA para o sistema de defesa do pneumococo, resultado do papel multifuncional da PspA na evasão imune, capaz de bloquear os

peptídeos antimicrobianos, seja como uma barreira física, onde eles podem se ligar diretamente a peptídeos antimicrobianos, já que a PspA é uma proteína altamente carregada negativamente que podem atrair e se ligar eletrostaticamente a esses AMPs, como as defensinas ou a indolicidina, sequestrando essas moléculas e impedindo que eles alcancem e danifiquem a membrana bacteriana, reduzindo a concentração efetiva do HNP-I livre e impedindo que ele exerça seu efeito microbicida por formação de poros e lise celular. Especialmente no caso da HPN-I que pela natureza catiônica promove essa atração eletrostática, priorizando atuar em superfícies bacterianas com carga negativa. A presença da PspA, ancorada na parede por meio da colina, modifica a superfície bacteriana, reduzindo o acesso do HNP-I e reforçando a barreira física entre o peptídeo e a membrana celular. (WAZ et al., 2024; HÅKANSSON, 2001; TU et al., 2022)

Além disso, a PspA atua inibindo a deposição de C3b e a ligação da proteína C reativa (CRP), o que compromete a opsonização e a fagocitose. Essa ação faz com que o pneumococo fique menos exposto aos neutrófilos, células que irão liberar o HNP-I, reduzindo as chances de o peptídeo atingir níveis letais sobre a bactéria. Assim, a proteção contra o HNP-I não é apenas física, mas também ocorre de forma indireta, ajudando o pneumococo a escapar do sistema imune. Adicionalmente, a PspA também pode atuar como adesina, facilitando a ligação do pneumococo a células epiteliais do trato respiratório e contribuindo para o estabelecimento da colonização inicial. A ausência da PspA remove um importante escudo protetor, expondo a membrana bacteriana à ação direta do peptídeo.

Ainda sobre os mecanismos de ação da PspA, os ensaios com adição de fragmento recombinante N-terminal de PspA (rPspA94) demonstraram um aumento significativo na quantidade de bactérias sobreviventes no grupo tratado com HNP-I previamente incubado com rPspA94, em comparação ao controle com BSA, o que sugere que a PspA livre é capaz de interagir diretamente com o peptídeo, neutralizando parcial ou totalmente sua ação microbicida.

Esse efeito pode ser explicado pela natureza anfipática e catiônica do HNP-I, cuja ação depende de sua interação eletrostática com a superfície bacteriana. A PspA, por conter regiões carregadas negativamente e domínio rico em prolina, pode atuar como um “sumidouro” para o peptídeo, reduzindo sua disponibilidade para se ligar à parede celular do pneumococo. Essa hipótese é compatível com estudos prévios que descrevem o papel da PspA na inibição de componentes do sistema imune, como o complemento e a lactoferrina, através de interações diretas

proteína-proteína que resultam em neutralização funcional (BRILES *et al.*, 2000; KHAZAEI *et al.*, 2019).

Além disso, os resultados demonstram que uma PspA recombinante livre, ou seja, não ancorada à superfície bacteriana, também é capaz de exercer esse efeito protetor, reforçando a ideia de que a proteção conferida pela PspA independe exclusivamente de sua localização estrutural na parede celular. Em ambiente infeccioso, a liberação de PspA durante a lise bacteriana ou o “shedding” de proteínas de superfície pode contribuir para a neutralização de peptídeos antimicrobianos no microambiente, funcionando como um mecanismo adicional de evasão da imunidade inata. A capacidade da rPspA94 de atenuar a ação do HNP-I sugere que a interação entre esses componentes pode representar um importante mecanismo de resistência do pneumococo às defesas do hospedeiro, com implicações relevantes para o desenvolvimento de terapias e vacinas baseadas em PspA.

A PspA é amplamente reconhecida como um fator de virulência que dificulta a deposição de complemento e a ligação de moléculas catiônicas à superfície bacteriana (BRILES *et al.*, 2000; HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000). Sua estrutura contém regiões carregadas negativamente, especialmente na porção N-terminal, que ajudam a repelir peptídeos catiônicos, como as defensinas humanas. Quando os anticorpos se ligam à PspA, essa barreira eletrostática é parcialmente neutralizada, deixando a superfície bacteriana mais exposta e permitindo que o HNP-I atue com maior eficiência (PESCHEL, 2002).

A presença de anticorpos específicos anti-PspA potencializou significativamente a atividade antimicrobiana do peptídeo HNP-I contra o pneumococo. A redução de aproximadamente 60% na sobrevivência bacteriana, observada após a incubação com soro imune anti-PspA, sugere que a neutralização da PspA remove um importante mecanismo de proteção superficial do pneumococo, tornando-o mais vulnerável à ação dos peptídeos antimicrobianos.

A opsonização mediada pelos anticorpos pode induzir rearranjos conformacionais na superfície da bactéria, alterando a distribuição de proteínas associadas à parede celular e favorecendo a ação direta dos peptídeos antimicrobianos. Esse efeito sinérgico entre imunidade adaptativa (anticorpos) e imunidade inata (defensinas) já foi proposto em estudos anteriores, que apontam que a combinação de resposta humoral específica e mecanismos inatos resulta em eliminação mais eficiente de patógenos encapsulados (LU *et al.*, 2017).

Os achados reforçam a hipótese de que a PspA atua como um escudo protetor contra peptídeos antimicrobianos, e que sua neutralização por anticorpos específicos restaura a sensibilidade bacteriana. Esses resultados têm implicações importantes para a patogênicidade do pneumococo e a forma como ele interage com a imunidade inata.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou a contribuição da proteína de superfície PspA e da cápsula polissacarídica para a resistência do *Streptococcus pneumoniae* à ação bactericida da defensina humana HNP-I, um componente fundamental da imunidade inata. A partir dos ensaios realizados, foi possível constatar que a resposta do pneumococo à HNP-I não é uniforme e depende da presença e da atuação de fatores de virulência de superfície, os quais influenciam diretamente a sobrevivência bacteriana e, consequentemente, seu potencial patogênico.

A comparação entre pneumococos de diferentes sorotipos capsulares evidenciou variações na susceptibilidade ao tratamento com HNP-I. Essas diferenças indicam que características associadas ao sorotipo interferem na interação do pneumococo com a defensina, refletindo comportamentos distintos frente a um mecanismo inicial de defesa do hospedeiro.

Ainda no que se refere à cápsula polissacarídica, conclui-se que o seu papel na resistência ao HNP-I não é uniforme, nem universal. Embora a presença da cápsula possa influenciar a ação da defensina em determinados contextos, esse efeito mostrou-se dependente do sorotipo e não se apresentou de forma consistente entre as cepas analisadas. Dessa maneira, a cápsula atua como um fator modulador da resposta à HNP-I, sem se categorizar um mecanismo dominante de proteção.

Em contraste, a análise da proteína de superfície PspA revelou um padrão consistente de proteção frente à ação da HNP-I. As cepas mutantes que não expressam PspA apresentaram maior susceptibilidade ao tratamento com a defensina quando comparadas às cepas selvagens, indicando que a presença dessa proteína está associada à maior capacidade de sobrevivência bacteriana. De forma concordante, a adição de PspA recombinante resultou em aumento da sobrevivência do pneumococo, enquanto a presença de anticorpos anti-PspA intensificou a ação bactericida da HNP-I. Esses resultados, observados de maneira reprodutível em diferentes abordagens experimentais, indicam que a PspA contribui para a resistência do pneumococo ao HNP-I possivelmente por atuar como uma barreira funcional na superfície bacteriana, por interferir na interação direta da defensina com a parede e a membrana celular e por favorecer o sequestro ou neutralização de peptídeos antimicrobianos, dessa forma contribuindo de forma direta para o seu potencial patogênico.

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo demonstram que a resistência do *Streptococcus pneumoniae* à defensina humana HNP-I é fortemente influenciada pela presença da PspA e da cápsula polissacarídica, de maneira integrada e dependente do sorotipo. Esses fatores de

virulência modulam a interação entre o pneumococo e a imunidade inata, contribuindo para o potencial patogênico da bactéria ao reduzir a eficácia de mecanismos naturais de defesa do hospedeiro. Dessa forma, este trabalho amplia a compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência do pneumococo aos peptídeos antimicrobianos e reforça a importância dessas estruturas de superfície na patogênese das infecções pneumocócicas.

REFERÊNCIAS

ABDUL RAHMAN, N. A.; MOHD DESA, M. N.; MASRI, S. N.; TAIB, N. M.; SULAIMAN, N.; HAZMAN, H.; JOHN, J. The molecular approaches and challenges of *Streptococcus pneumoniae* serotyping for epidemiological surveillance in the vaccine era. *Polish Journal of Microbiology*, v. 72, n. 2, p. 103–115, 2023. DOI: 10.33073/pjm-2023-023.

ALVES, L. F. *Efeito dos anticorpos anti-PspA na ação lítica da lactoferrina sobre Streptococcus pneumoniae*. Bragança Paulista: Universidade São Francisco, 2012.

ANDRÉ, G. O.; CONVERSO, T. R.; POLITANO, W. R.; FERRAZ, L. F. C.; RIBEIRO, M. L.; LEITE, L. C. C.; DARRIEUX, M. Role of *Streptococcus pneumoniae* proteins in evasion of complement-mediated immunity. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 224, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00224.

ANDREJKO, K.; RATNASIRI, B.; HAUSDORFF, W.; LAXMINARAYAN, R.; LEWNARD, J. Antimicrobial resistance in pediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates amid global implementation of pneumococcal conjugate vaccines: a systematic review and meta-regression analysis. *The Lancet Microbe*, v. 2, p. e450–e460, 2021. DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00064-1.

ASSONI, L.; MILANI, B.; CARVALHO, M. R.; NEPOMUCENO, L. N.; WAZ, N. T.; GUERRA, M. E. S.; SOUZA, M. A. G.; MARTINS, E. A.; OLIVEIRA, L. C.; SILVA, R. M. Resistance mechanisms to antimicrobial peptides in Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 2362, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.593215.

BAXTER, A. A.; LAY, F. T.; PANYCHENKO, M.; TJHUNG, K. F.; BOJARSKI, E. M.; HUGHES, T. E.; COTTERELL, A. J.; ANDERSON, M. A.; CURTIS, R.; HULSBROEK, P.; BLEACKLEY, M. R.; ANDO, I.; HUMPHRYS, L. J.; HANKAMMER, M.; VAN DER WEIJDEN, T.; LEE, T. H.; HINE, P.; ZEHLER, M.; SWEENEY, E. The tomato defensin TPP3 binds phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate via a conserved dimeric cationic grip conformation to mediate cell lysis. *Molecular and Cellular Biology*, v. 35, n. 11, p. 1964–1978, 2015. DOI: 10.1128/MCB.00282-15.

BEITER, K.; WARTHA, F.; HURWITZ, R.; NORMARK, S.; ZYCHLINSKY, A.; HENRIQUES-NORMARK, B. The capsule sensitizes *Streptococcus pneumoniae* to α -defensins human neutrophil proteins 1 to 3. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 2, p. 631–639, 2008. DOI: 10.1128/IAI.01115-07.

BEZHUK, YU. A.; FEDORCHUK, O. M.; TSYMBAL, I. V.; ZHUK, R. A.; PETRUK, N. O. The role of defensins in non-specific protection. *Ukrains'kij žurnal medicini, biologii ta sportu*, v. 7, n. 3, p. 7–13, 2022. DOI: 10.26693/jmbs07.03.007.

BIN HAFEEZ, A.; JIANG, X.; BERGEN, P. J.; ZHU, Y. Antimicrobial peptides: an update on classifications and databases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 21, p. 11691, 2021. DOI: 10.3390/ijms222111691.

BRILES, D. E.; PATON, J. C.; MUKERJI, R.; SWIATLO, E.; CRAIN, M. J. Pneumococcal vaccines. *Microbiology Spectrum*, v. 7, n. 6, 2019. DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0028-2018.

BRISSAC, T.; MARTÍNEZ, E.; KRUCKOW, K. L.; RIEGLER, A. N.; GANAIE, F.; IM, H.; EL-MAYTA, R.; SIDDIQI, F.; BENTON, K. A.; BRILES, D. E.; TUOMANEN, E.; ANDREWS, N.; DENNIS, E. A.; YOTHER, J.; WOROBAY, M.; MCVERRY, B. J. Capsule promotes intracellular survival and vascular endothelial cell translocation during invasive pneumococcal disease. *mBio*, v. 12, n. 5, e0251621, 2021. DOI: 10.1128/mBio.02516-21.

BROOKS, L. R. K.; MIAS, G. I. *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1366, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01366.

CAMPOS, M.; VARGAS, M.; BENGOCHEA, J.; LLOMPART, C.; ALBERTÍ, S.; REGUEIRO, V. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 12, p. 7107–7114, 2004. DOI: 10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004.

CHERAZARD, R.; HAGAN, C.; MARTIN, N.; NEGRÓN, O.; HAIDAR, G.; ZARAGOZA, J. Antimicrobial resistant *Streptococcus pneumoniae*: prevalence, mechanisms, and clinical implications. *American Journal of Therapeutics*, v. 24, n. 3, p. e361–e369, 2017. DOI: 10.1097/MJT.0000000000000551.

CIEŚLIK, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; ROCHMIŃSKA, M.; ZAWADZKA, A.; ADAMUS-BIAŁEK, W. Human β -defensin-2 and its postulated role in modulation of the immune response. *Cells*, v. 10, n. 11, p. 2991, 2021. DOI: 10.3390/cells10112991.

CILLÓNIZ, C.; LIAPIS, E.; DOMINQUEZ, M. A.; ALIBERTI, S.; TORRES, A. What is the clinical relevance of drug-resistant pneumococcus? *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v. 22, n. 3, p. 227–234, 2016. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000262.

CONVERSO, T. R.; ASSONI, L.; ANDRÉ, V. A. I.; DARRIEUX, M.; LEITE, L. C. C. The long quest for a serotype-independent pneumococcal vaccine. *Expert Review of Vaccines*, v. 19, n. 1, p. 57–70, 2020. DOI: 10.1080/14760584.2020.1711055.

DI, Y.; DESLOUCHES, B. Peptídeos antimicrobianos com mecanismos antitumorais seletivos: perspectiva para aplicações anticâncer. *Oncotarget*, v. 8, p. 46635–46651, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.16743.

FELDMAN, C.; ANDERSON, R. Pneumococcal virulence factors in community-acquired pneumonia. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v. 26, n. 3, p. 222–231, 2020. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000674.

FRÓES, D. G. *Estudo funcional da proteína de superfície PspA frente a peptídeos antimicrobianos em Streptococcus pneumoniae*. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2019.

FRUITWALA, S.; EL-NACCACHE, D. W.; CHANG, T. L. Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 88, p. 163–172, 2019. DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.02.023.

GANAIË, F.; SAAD, J. S.; MCGEE, L.; SALLU, O. T.; NEVAGRAI, T.; BRAUN, J. M.; SAKA, H.; BAGGETT, H. C.; BEALL, B. W. A new pneumococcal capsule type, 10D. *mBio*, v. 11, n. 3, e00937-20, 2020. DOI: 10.1128/mBio.00937-20.

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 3, p. 710–720, 2003. DOI: 10.1038/nri1180.

GAO, X.; LI, G.; SHANG, Y.; WANG, Y. Defensins: the natural peptide antibiotic. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 179, 114008, 2021. DOI: 10.1016/j.addr.2021.114008.

GATINONI, L. M. Interações entre PspA e peptídeos antimicrobianos: implicações para a patogenicidade pneumocócica. *Revista de Ciências da Saúde*, v. 10, p. 99–105, 2021.

GENO, K.; GILBERT, G. L.; SONG, J.; SKOVSTED, I. C.; KLUGMAN, K.; JONES, C.; KONRADSEN, H. B.; NAHM, M. H. Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, p. 871–899, 2015. DOI: 10.1128/CMR.00024-15.

HÅKANSSON, A.; ROCHE, H.; MIRZA, S.; McDANIEL, L. S.; BROOKS-WALTER, A.; BRILES, D. E. Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein

A. *Infection and Immunity*, v. 69, n. 5, p. 3372–3381, 2001. DOI: 10.1128/IAI.69.5.3372-3381.2001.

HARTMAN, N.; UM, S.; TANG, S.; DIAS, B.; HIEBERT, E. Clinical trial of alpha and beta defensin skin care regimen. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 22, n. 9, p. 874–880, 2023. DOI: 10.36849/JDD.7184.

HEIN, M. J. A.; WANG, Y.; CUI, L.; DUNN, S. E.; YANG, R.; QIN, W. Defensin–lipid interactions in membrane targeting. *Biochemical Society Transactions*, v. 50, n. 1, p. 423–437, 2022. DOI: 10.1042/BST20200884.

HENRIQUES, B.; PERROTTA, F.; NORMARK, B. H.; LAGERGÅRD, T.; QUARTIN, A.; GARCÍA, M.; SAUNDERS, J.; BROWALL, S.; TROLLE, T.; PELTON, S. Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in five countries. *Journal of Infectious Diseases*, v. 182, n. 3, p. 833–839, 2000. DOI: 10.1086/315761.

HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, v. 68, n. 10, p. 5889–5900, 2000. DOI: 10.1128/IAI.68.10.5889-5900.2000.

HOLLY, M. K.; DIAZ, K.; SMITH, J. G. Defensins in viral infection and pathogenesis. *Annual Review of Virology*, v. 4, n. 1, p. 369–391, 2017. DOI: 10.1146/annurev-virology-101416-041734.

HUME-NIXON, M.; RALPH, A. P.; WHITMAN, T. J.; SANDERSON-SMITH, M. L.; O'GRADY, K. A. F. Systematic review of the clinical outcomes of pneumonia with a penicillin-group resistant pneumococcus. *Journal of Global Health*, v. 12, p. 10004, 2022. DOI: 10.7189/jogh.12.10004.

JINDAL, H. M.; LE, C. F.; MOHD YUSOF, M. Y.; VELAYUTHAN, R. D.; LEE, V. S.; ZAIN, S. M.; ABDULLAH, N.; SEOW, H. F.; RALF, S. Antimicrobial activity of novel synthetic peptides derived from indolicidin and ranalexin against *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS ONE*, v. 10, n. 6, e0128532, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0128532.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, J. C.; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 4, p. 288–301, 2008. DOI: 10.1038/nrmicro1871.

KHAZAEI, R.; ATAIE, M.; MOUSAVI, S. A.; GHANBARI, S.; KHOSRAVI, A. Protective responses of an engineered PspA recombinant antigen against *Streptococcus pneumoniae*. *Biotechnology Reports*, v. 24, e00385, 2019. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00385.

KIETZMAN, C. C.; GAO, G.; MANN, B.; MYERS, L.; TUOMANEN, E. I. Dynamic capsule restructuring by the main pneumococcal autolysin LytA in response to the epithelium. *Nature Communications*, v. 7, 10859, 2016. DOI: 10.1038/ncomms10859.

LANE, J. R.; TATA, M.; BRILES, D.; ORIHUELA, C. J. A jack of all trades: the role of pneumococcal surface protein A in *Streptococcus pneumoniae* pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.826264.

LAZZARO, B. P.; ZASLOFF, M.; ROLFF, J. Antimicrobial peptides: application informed by evolution. *Science*, v. 368, n. 6490, 2020. DOI: 10.1126/science.aau5480.

LI, J.; GLOVER, D. T.; SZALAI, A. J.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. PspA and PspC minimize immune adherence. *Infection and Immunity*, v. 75, p. 5877–5885, 2007. DOI: 10.1128/IAI.00839-07.

LOPES, B. S.; HANAFIAH, A.; NACHIMUTHU, R.; MUTHUPANDIAN, S.; MD NESRAN, Z. N.; PATIL, S. The role of antimicrobial peptides as antimicrobial and antibiofilm agents in tackling the silent pandemic of antimicrobial resistance. *Molecules*, v. 27, n. 9, p. 2995, 2022. DOI: 10.3390/molecules27092995.

LLOBET, E.; TOMÁS, J. M.; BENGOCHEA, J. A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology*, v. 154, p. 3877–3886, 2008. DOI: 10.1099/mic.0.2008/022301-0.

LOUGHRAN, A. J.; ORIHUELA, C. J.; TUOMANEN, E. I. *Streptococcus pneumoniae*: invasion and inflammation. *Microbiology Spectrum*, v. 7, n. 2, 2019. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0004-2018.

LYU, Z.; XU, X.; SONG, H.; LI, F.; JIANG, P.; LI, T.; WANG, H.; GAO, W.; LI, J.; HUANG, L.; ZHANG, W. A hospital-based and cross-sectional investigation on clinical characteristics of pediatric *Streptococcus pneumoniae* isolates in Beijing from 2015 to 2021. *Infection and Drug Resistance*, v. 16, p. 499–508, 2023. DOI: 10.2147/IDR.S398549.

LU, L. L.; SUSCOVICH, T.; FORTUNE, S. M.; ALTER, G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, p. 46–61, 2017. DOI: 10.1038/nri.2017.106.

MACHADO, L. R.; OTTOLINI, B. An evolutionary history of defensins. *Frontiers in Immunology*, v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00115.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L.; BJÖRN, C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 6, 194, 2016. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00194.

MATANOCK, A.; LEE, G.; GIERKE, R.; KOBAYASHI, M.; LEIDNER, A.; PILISHVILI, T. Use of 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine and 23-Valent Pneumococcal Polysaccharide Vaccine Among Adults Aged ≥ 65 Years: updated recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 68, n. 46, p. 1069–1075, 2019. DOI: 10.15585/mmwr.mm6846a5.

MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 16, n. 5, p. 411–418, 2010. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03183.x.

MILANI, B. *Papel da proteína PspA na resistência a peptídeos antimicrobianos do tipo catelicidina e defensina*. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2019.

MIN, J.; JIN, M.; WANG, Y.; WANG, F.; ZONG, X.; FU, J. Mechanisms and regulation of defensins in host defense. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 8, 2023. DOI: 10.1038/s41392-023-01553-x.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação*. Brasília: MS, 2020. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_epidemiologica_eventos_adverso_pos_vacinacao.pdf. Acesso em: 25 out. 2024.

MSD BRASIL. Pneumovax 23 – bula do profissional de saúde. São Paulo: MSD, 2024. Disponível em: https://www.msd.com.br/wp-content/uploads/sites/86/2024/10/pneumovax_pro.pdf. Acesso em: 25 out. 2024.

PARISI, K.; SHAFEE, T. M. A.; CRUZ, M.; CARVALHO, A.; ANDERSON, M. A.; VAN DER

WEIJDEN, T.; KLAUSEMEYER, J.; VRIJENHOEK, J.; BLEACKLEY, M. R.; WILSON, S. M. The evolution, function and mechanisms of action for plant defensins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 88, p. 107–118, 2019. DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.02.004.

PATON, J. C.; TRAPPETTI, C. *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. *Microbiology Spectrum*, v. 7, 2019. DOI: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0019-2018.

PESCHEL, A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology*, v. 10, n. 4, p. 179–186, 2002. DOI: 10.1016/S0966-842X(02)02333-8.

PÓVOA, H.; DOLORES, Í.; CABRAL, A.; DA SILVA, A.; NEVES, F.; KNUPP-PEREIRA, P. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* before and after the introduction of pneumococcal conjugate vaccines in Brazil: a systematic review. *Antibiotics*, v. 13, 2024. DOI: 10.3390/antibiotics13010066.

POLESELLO, V.; MONTECCHI, E.; PAROLIN, C.; FILIPPINI, R.; BOUGAIN, A. Candida infections and human defensins. *Protein & Peptide Letters*, v. 24, n. 8, 2017. DOI: 10.2174/0929866524666170807125245.

REINERT, R. R. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, suppl. 3, p. 7–11, 2009. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02724.x.

REN, B.; SZALAI, A. J.; THOMAS, O.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 1, p. 75–85, 2003. DOI: 10.1128/IAI.71.1.75-85.2003.

SAFDAR, A.; IFTIKHAR, S.; ZAHID, G. Role of defensins in innate immunity. *Journal of Shifa Tameer-e-Millat University*, v. 4, n. 2, p. 117–123, 2021. DOI: 10.32593/jstmu/Vol4.Iss2.159.

SENKOVICH, O.; MIGNERY, G. A.; GAO, X.; JOYNER, J. C.; MARTINEZ, J.; MOUSEL, M. R.; KIM, J.; WALLACE, S. S. Structure of the PspA–lactoferrin complex reveals insights into resistance to host immunity. *Journal of Molecular Biology*, v. 370, p. 701–713, 2007. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.04.075.

SELSTED, M. E.; OUELLETTE, A. J. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells. *Trends in Cell Biology*, v. 5, n. 3, p. 114–119, 1995. DOI: 10.1016/S0962-8924(00)88961-8.

SHAK, J. R.; VIDAL, J. E.; KLUGMAN, K. P. Influence of bacterial interactions on

pneumococcal colonization of the nasopharynx. *Trends in Microbiology*, v. 21, p. 129–135, 2013. DOI: 10.1016/j.tim.2012.11.005.

SHAPER, M.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BENJAMIN Jr., W. H.; BRILES, D. E. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 9, p. 5031–5040, 2004. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5031-5040.2004.

SJÖSTRÖM, K.; SPINDLER, C.; ORTQVIST, A.; KALIN, M.; SANDGREN, A.; KÜHLMANN-BERENZON, S.; HENRIQUES-NORMARK, B. Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, v. 42, n. 4, p. 451–459, 2006. DOI: 10.1086/499242.

SLAGER, J.; APRIANTO, R.; VEENING, J.-W. Deep genome annotation of the opportunistic human pathogen *Streptococcus pneumoniae* D39. *Nucleic Acids Research*, v. 46, p. 9971–9989, 2018. DOI: 10.1093/nar/gky725.

TAI, S. S. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: current status and future prospects. *Vaccine*, v. 24, p. 4269–4292, 2006. DOI: 10.1080/10408410600822942.

TAUB, A.; STEINBERG, S.; DUBLÓN, A.; TESSLER, E.; MICHEL, O.; SAYER, G.; RICHARDSON, R. Multi-center, double-blind, vehicle-controlled clinical trial of an alpha and beta defensin-containing anti-aging skin care regimen. *Journal of Drugs in Dermatology*, v. 17, n. 4, p. 426–441, 2018. PMID: 29601620.

TOIT, M. de; HUCH, M.; CHO, G.-S.; FRANZ, C. M. A. P. The family Streptococcaceae. In: HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. B. (eds.). *Lactic acid bacteria*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781118655252.part6>.

TU, A. H.; FULGHAM, R. L.; McCRORY, M. A.; BRILES, D. E.; SZALAI, A. J. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, v. 67, n. 9, p. 4720–4724, 1999. DOI: 10.1128/IAI.67.9.4720-4724.1999.

UNDERWOOD, M. A.; BEVINS, C. L. Defensin-barbed innate immunity: clinical associations in the pediatric population. *Pediatrics*, v. 125, n. 6, p. 1237–1247, 2010. DOI: 10.1542/peds.2009-3289.

WANG, J.; LI, R.; LIU, S.; ZHANG, Y.; LI, L.; MENG, X.; DU, Y. Clinically relevant detection of *Streptococcus pneumoniae* with DNA–antibody nanostructures. *Analytical Chemistry*, v. 89, n. 12, p. 6900–6906, 2017. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b01508.

WAZ, N. T.; FERREIRA, T. F.; ASSONI, L.; NEPOMUCENO, L. N.; GOMES, V. M.; FRÓES, D.; GUERRA, M. E. S.; ZOLA, C. Pneumococcal surface protein A (PspA) prevents killing of *Streptococcus pneumoniae* by indolicidin. *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, 23517, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-73564-9.

WAZ, N. T.; NEPOMUCENO, L. N.; ASSONI, L.; MILANI, B.; FRÓES, D.; GUERRA, M. E. S.; GOMES, V. M.; CARVALHO, M. R. Influence of the capsular polysaccharide on the bactericidal activity of indolicidin in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 898815, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.898815.

WIENS, M. E.; SMITH, J. G. α -defensin HD5 inhibits human papillomavirus 16 infection via capsid stabilization and redirection to the lysosome. *mBio*, v. 8, n. 1, 2017. DOI: 10.1128/mBio.02304-16.

XU, D.; LU, W. Defensins: a double-edged sword in host immunity. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 764, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00764.

YOTHER, J. Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annual Review of Microbiology*, v. 65, p. 563–581, 2011. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162944.

YUAN, J.; ZHANG, L.; KONG, M.; LIU, H.; ZHANG, X. Diagnostic accuracy of alpha-defensin in periprosthetic joint infection: a systematic review and meta-analysis. *International Orthopaedics*, v. 41, n. 12, p. 2447–2455, 2017. DOI: 10.1007/s00264-017-3647-3.

ZHAI, Y.-J.; LIU, S.; ZHANG, W.; CHEN, H.; TANG, Y.; WANG, Y.; SUN, L.; LI, R. Defensins: defenders of human reproductive health. *Human Reproduction Update*, v. 29, n. 1, p. 126–154, 2023. DOI: 10.1093/humupd/dmac032.

ZHANEL, G. G.; LYNCH, J. P.; ADAM, H. J. *Streptococcus pneumoniae* serotyping and antimicrobial susceptibility: assessment for vaccine efficacy in Canada after the introduction of PCV13. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 78, suppl. 1, p. i2–i7, 2023. DOI: 10.1093/jac/dkad064.

ZHANG, L.; McNEIL, B. D. Beta-defensins are proinflammatory pruritogens that activate Mrgpr_s. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 143, n. 5, p. 1960–1962.e5, 2019. DOI: 10.1016/j.jaci.2019.01.013.

ZHAO, L.; LU, W. Defensins in innate immunity. *Current Opinion in Hematology*, v. 21, n. 1, p. 37–42, 2014. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000005.

ZHARKOVA, M.; ORLOV, D.; GOLUBEVA, O.; CHAKCHIR, O.; ELISEEV, I.; GRINCHUK, T.; SHAMOVA, O. Application of antimicrobial peptides of the innate immune system in combination with conventional antibiotics: a novel way to combat antibiotic resistance? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, e128, 2019. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00128.

ANEXO I: Aprovação do Comitê de ética em Pesquisa



Bragança Paulista, 26 de maio de 2022

Projeto de Pesquisa: “*Papel da cápsula polissacarídica (sorotipos 2 e 4) na ação de peptídeos antimicrobianos catiônicos sobre o pneumococo*”.

Pesquisadora: Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini

Colaboradores: Sheila Oliveira; Thiago Coverso

Área de Conhecimento: Imunologia Aplicada – 2.11.04.00-0

Colaboradores: Nenhum

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo: V2.005.05.2022

IP. Ciuca: 200.225.122.34

CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014

Vigência do Projeto: 01/06/2022 – 20/12/2023

Número e Animais: 20

Espécie: Camundongo isogênico

Peso: 20gr

Idade: 5-7 semanas

Linhagem: BALB/c

Espécie: Fêmeas

Procedência do Animal: Biotério/CEMIB - UNICAMP

Prezada Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa – CEUA, da Universidade São Francisco analisou em reunião no dia 26/05/2022, 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**

Profa. Giovanna Barbarini Longato
Coordenadora do Comitê de Ética com
Uso de Animais de Experimentação

ANEXO II: Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA).



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Papel da cápsula polissacarídica (sorotipos 2 e 4) na ação de peptídeos antimicrobianos catiônicos sobre o pneumococo”. Protocolo V2.005.05.2022 sob responsabilidade do 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 26/05/2022.

Projeto de Pesquisa: “*Papel da cápsula polissacarídica (sorotipos 2 e 4) na ação de peptídeos antimicrobianos catiônicos sobre o pneumococo*”.

Pesquisadora: Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini

Colaboradores: Sheila Oliveira; Thiago Coverso

Área de Conhecimento: Imunologia Aplicada – 2.11.04.00-0

Colaboradores: Nenhum

Instituição: Universidade São Francisco

Protocolo: V2.005.05.2022

IP. Ciuca: 200.225.122.34

CIAEP/CONCEA Nº 01.226.2014

Vigência do Projeto: 01/06/2022 – 20/12/2023

Número e Animais: 20

Espécie: Camundongo isogênico

Peso: 20gr

Idade: 5-7 semanas

Linhagem: BALB/c

Espécie: Fêmeas

Procedência do Animal: Biotério/CEMIB - UNICAMP

Prof. Giovanna Barbarini Longato
Coordenadora do Comitê de Ética com
Uso de Animais de Experimentação