



RESISTÊNCIA DE *Streptococcus pneumoniae* a PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS ISOLADOS DE NEUTRÓFILOS

*RESISTANCE OF Streptococcus pneumoniae to ANTIMICROBIAL PEPTIDES ISOLATED FROM
NEUTROPHILS*

TERRIBILE, Bruna Jansons¹; PINHATAR, Cleide Lucatto¹; DARRIEUX, Michelle²

¹Graduanda do Curso de Biomedicina – Universidade São Francisco;

²Docente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Universidade São Francisco;

brunaterribile@gmail.com

cleidepinhatar@hotmail.com

RESUMO

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é um patógeno responsável por elevada mortalidade. Coloniza o trato respiratório superior de forma assintomática e pode, sob certas circunstâncias, invadir os demais tecidos causando diversas doenças como otite média, pneumonia, meningite e sepse. Dentre os principais fatores de virulência bacterianos deste patógeno destacam-se a proteína de superfície de pneumococo A (PspA) e a cápsula polissacarídica (CPS) que atuam reduzindo a deposição de proteínas do Sistema Complemento e ação de 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. Este projeto tem como objetivo avaliar o papel da proteína PspA e da cápsula polissacarídica na ação do HNP-1 sobre o pneumococo. Bactérias selvagem e mutantes que não produzem cápsula foram tratados com HNP-1 e a sobrevivência foi calculada em relação ao controle não tratado. Em seguida, as bactérias foram tratadas com HNP-1 na presença ou ausência de anticorpos anti-PspA e PspA recombinante. As bactérias selvagens e mutantes apresentaram resistência variável ao HNP-1, dependendo do sorotipo capsular. A adição de anticorpos anti-PspA favoreceu a ação bactericida de HNP-1, enquanto PspA recombinante resgatou a bactéria dos efeitos do AMP. Em conjunto, os dados deste trabalho indicam que a cápsula e a proteína PspA protegem o pneumococo contra a ação do HNP-1, um importante mecanismo de defesa que pode ser explorado para combater este patógeno.

Palavras-chave: Pneumococo, AMPs, HNP, defensina, PspA.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) is a pathogen responsible for high mortality. It colonizes the upper respiratory tract asymptotically and can, under certain circumstances, invade other tissues, causing various diseases such as otitis media, pneumonia, meningitis, and sepsis. Among the main bacterial virulence factors of this pathogen, the pneumococcal surface protein A (PspA) and the polysaccharide capsule (CPS) stand out, which act by reducing the deposition of Complement System proteins and the action of antimicrobial peptides (AMP) on the bacterial. An important human AMP is HNP-I, a neutrophil alpha-defensin that has antimicrobial and immunomodulatory action. It is known that pneumococcus is partially

resistant to the action of alpha-defensins, however, the mechanisms responsible for resistance to this family of AMPs are not completely understood. This project aims to evaluate the role of the PspA protein and the polysaccharide capsule in the action of HNP-1 on pneumococcus. Wild-type and non-capsule-producing mutant bacteria were treated with HNP-1 and survival was calculated relative to untreated control. Then, the bacteria were treated with HNP-1 in the presence or absence of anti-PspA and recombinant PspA antibodies. Wild and mutant bacteria showed variable resistance to HNP-1, depending on the capsular serotype. The addition of anti-PspA antibodies favored the bactericidal action of HNP-1, while recombinant PspA rescued the bacteria from the effects of AMP. Together, the data from this work indicate that the PspA protein capsule protects pneumococcus against the action of HNP-1, an important defense mechanism that can be exploited to combat this pathogen.

Keywords: Pneumococcus, AMPs, HNP, defensin, PspA.

INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae (pneumococo) é um dos patógenos com maior índice de mortalidade do mundo, principal agente etiológico em infecções respiratórias adquiridas na comunidade, causador de doenças como sinusite, bronquite, pneumonia e meningite. (BEITER, 2008) É caracterizado como diplococo, anaeróbio facultativo, Gram-positivo, encapsulado, α -hemolítico e catalase-negativo. Apresenta superfície bacteriana constituída por membrana plasmática rica em moléculas de ácido lipoteicóico, pela parede celular polissacarídica com associação de ácido teicóico e pela cápsula polissacarídica, importante fator de virulência. (FRÓES, 2019)

As vacinas pneumocócicas atuais são baseadas em polissacarídeos capsulares altamente imunogênicos, isolados ou combinados a proteínas carreadoras, e são considerados uma estratégia eficaz. No entanto, tais vacinas não possuem cobertura vacinal completa pois contemplam apenas uma pequena fração dos pneumococos da população, frente a mais de 90 sorotipos descritos para *S. pneumoniae*. Além disso, sabe-se o pneumococo desenvolveu resistência a determinados antibióticos e medicamentos comuns para tratamento respiratório e que vacinas conjugadas têm elevado custo de produção, que resulta na falta de acessibilidade em países subdesenvolvidos. (FRÓES, 2019) Com isso, os peptídeos antimicrobianos (AMPs), moléculas produzidas pela imunidade inata do hospedeiro como mecanismo inicial de defesa, surgem como alternativa para combater essa bactéria. (GATINONI, 2021)

Peptídeos Antimicrobianos

Os peptídeos antimicrobianos catiônicos (CAMPs) são pequenas proteínas produzidos nas mucosas e outros tecidos de um hospedeiro que está sob infecção de microrganismos patogênicos como o *Streptococcus pneumoniae*. As duas principais famílias de peptídeos antimicrobianos produzidas por mamíferos são as catelicidinas e as defensinas. As defensinas,

em sua maioria, são moléculas pequenas, anfipáticas e capazes de eliminar células bacterianas por permeabilização da membrana. São classificadas de acordo com a estrutura e o emparelhamento da cisteína em α -defensinas, com seis tipos, e β -defensinas, com 4 tipos e θ -defensinas. As α -defensinas denominadas HNPs1-4 são originadas em grânulos de neutrófilos e as HD5 e HD6 em células de Paneth. Já as β -defensinas, nomeadas HBDs1-4, têm sua origem em células epiteliais. (BEITER, 2008)

O papel das defensinas na eliminação de bactérias ocorre pela sua ligação à membrana plasmática, seguido de permeabilização, em razão do seu caráter anfipático combinado com a sua carga positiva (catiônico). Com isso, o potencial transmembrana e o gradiente de íons são rompidos e ocorre o extravasamento do conteúdo celular, causando a morte do microrganismo. (WAZ, 2020) Além de atuarem como antimicrobianos, as defensinas também apresentam efeitos imunomodulatórios como indução da quimiotaxia e promoção da fagocitose de microrganismos patogênicos. (GATINONI, 2021)

HNPs

As HNPs são divididas em seis subtipos, dentre as quais HNP-1, HNP-2, HNP-3 e HNP4 são encontradas em grânulos primários dos neutrófilos, chamados de azurófilos. Na fagocitose, os azurófilos se ligam a vacúolos fagocíticos, aumentando dessa forma a concentração de defensinas para facilitar a eliminação do patógeno. (GATINONI, 2021)

HNP-1, -2 e -3 possuem sequências de aminoácidos extremamente semelhantes entre si, a diferença se dá apenas no primeiro aminoácido de cada cadeia. HNP-1 possui alanina, enquanto a HNP-3 possui aspartato, contudo, ambas apresentam uma sequência de 30 aminoácidos. (GATINONI, 2021)

Peptídeos catiônicos e o pneumococo

Estudos do nosso grupo demonstraram que o pneumococo é parcialmente resistente à ação da lactoferrina e da indolicidina, duas moléculas com ação antimicrobiana. Essa resistência foi atribuída à presença da proteína de superfície de pneumococo A (PspA), que impede a ligação dos peptídeos à membrana bacteriana. Uma vez que estes peptídeos possuem mecanismos de ação semelhantes à HNP-1, o presente projeto tem como objetivo determinar se o potencial protetor de PspA contra a ação de AMPs inclui as HNPs. (WAZ, 2020)

Proteína de superfície PspA

A proteína de superfície de pneumococo A (PspA) encontra-se na parede celular bacteriana e apresenta quatro domínios principais em sua estrutura, o domínio N-terminal, uma região rica em prolina, um domínio de ligação à colina, responsável pela fixação da proteína à parede e, por fim, a região C-terminal. O domínio N-terminal se projeta para fora da cápsula polissacarídica, apresenta carga negativa e grande quantidade de formações alfa-hélice e é o fragmento mais imunogênico da PspA, região utilizada nas vacinas pneumocócicas e também neste trabalho. (FRÓES, 2019)

A proteína PspA atua reduzindo a deposição de proteínas produzidas pelo Sistema Complemento na superfície bacteriana que promovem o seu reconhecimento e em seguida, sua eliminação por fagócitos. A infecção por pneumococos induz a produção de anticorpos anti-PspA, o que indica que esta proteína é sintetizada durante a enfermidade. (FRÓES, 2019)

Com isso, este estudo tem o objetivo de avaliar a sensibilidade do *Streptococcus pneumoniae* ao peptídeo HNP-1 usando as cepas selvagens D39, sorotipo capsular 2, e TIGR4, sorotipo capsular 4. Além disso, investigar o papel da cápsula polissacarídica e da proteína de superfície de pneumococo A (PspA) como fatores protetivos, a partir de cepas mutantes para cápsula e cepas mutantes para o gene PspA. Usando a cepa selvagem encapsulada D39, pretende-se também verificar os efeitos da adição de polissacarídeos e de anticorpos anticapsulares nos ensaios com o peptídeo.

METODOLOGIA

Preparo do HNP-1

O peptídeo HNP-1 0,1mg comercial da marca ANASPEC (código AS-60743) foi ressuspenso em uma solução tampão 0,1% BSA (Albumina de Soro Bovino) e 0,01% ácido acético e armazenado em freezer -20°C.

Isolados de pneumococo

Os isolados de *S. pneumoniae* utilizados neste estudo foram a cepa D39, clado PspA 2, sorotipo capsular 2, a cepa TIGR4, clado PspA 3, sorotipo capsular 4, e a cepa JY53, mutante isogênico de D39 que não expressa PspA, cedidos gentilmente pelo Dr. David Briles da Universidade do Alabama (UAB). Além dessas, as cepas AM1000, clado PspA 2, mutante isogênico de D39 para cápsula e HR1001, clado PspA 4, mutante isogênico de TIGR4 para cápsula, cedidas gentilmente pelo Dr. Anders Hakansson da Lud University (LU), também foram utilizadas.

Cultivo bacteriano

No dia anterior ao experimento foram semeados 20 µl do estoque bacteriano congelado em placas de ágar sangue, pela técnica de esgotamento em estrias e spread-plate (espalhamento), e incubados overnight a 37°C, sem agitação, em jarra de anaerobiose.

No dia do experimento foi observado o crescimento bacteriano nas placas e ausência de contaminação. O cultivo bacteriano foi transferido, com auxílio de um swab, para 5 ml de meio líquido Todd Hewitt contendo 0,5 % de extrato de levedura (THY, pH=4), com densidade óptica (D.O.) ajustada entre 0,1 e 0,2 a 600nm e cultivado em estufa a 37°C, sem agitar, por aproximadamente 2 horas até alcançar D.O. de 0,3 a 0,4.

Após o crescimento, dois eppendorf contendo 1,5ml do cultivo foram centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e foi realizada lavagem destes com 1,5ml de tampão fosfato de sódio estéril (10mM, pH=7,4). A bactéria foi centrifugada novamente e ressuspenso com a mesma quantidade de tampão fosfato de sódio.

Montagem dos tubos

Efeito da PspA na ação lítica de HNPs

Para a diluição em diferentes concentrações do HNP-1, foram montados 8 tubos com concentrações em ordem crescente, sendo que os tubos 1 e 2 eram tubos controle.

Os tubos controles receberam fosfato de sódio e solução tampão de BSA e ácido acético em quantidades iguais. Nos tubos 3 a 6 foram adicionados o dobro de volume apenas de tampão fosfato de sódio, e nos tubos 7 e 8 foi adicionado o HNP-1.

Inicialmente, foram transferidos metade do volume do tubo 7 para o tubo 5, homogeneizando suavemente com a pipeta, em seguida, foi transferido o mesmo volume do tubo 5 para o tubo 3, homogeneizando novamente. Então, na última homogeneização essa quantidade foi descartada do tubo 3, resultando em tubos com concentrações de 25, 12,5 e 6,25 µg/ml de HNP. Este procedimento foi repetido nos tubos de números pares (do 8 ao 4), exceto controle. Por fim, foram adicionados em todos os tubos bactéria lavada e ressuspensa em tampão fosfato de sódio, inclusive nos tubos controle.

Os cultivos foram incubados a 37 °C durante 1 hora, sem agitação. Ao término da incubação, foram submetidos à diluição seriada, em uma microplaca de diluição com solução salina PBS estéril (1x, pH=7,4) em todos os poços.

Efeito dos anticorpos Anti-PspA na ação lítica do HNP-1

Para avaliar a capacidade dos anticorpos anti-PspA de bloquearem uma possível ação protetora da proteína contra os efeitos do HNP 1 em pneumococos selvagens, foi realizada uma etapa de pré-incubação em estufa 37°C, sem agitação, por 15 minutos com os anticorpos.

O soro anti-PspA utilizado foi obtido do tratamento de camundongos, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Utilização de Animais, da Universidade São Francisco, sob o protocolo nº V2.005.05.2022. (Anexo 1) Estes animais foram imunizados com dois fragmentos recombinantes de PspAs da família 1, a proteína PspA 94 (clado 2) homóloga à PspA expressa pela bactéria em estudo, e a proteína PspA 245 (clado 1), heteróloga, porém da mesma família. (FRÓES, 2019)

O pneumococo centrifugado foi ressuspensa em tampão fosfato de sódio e foi submetido a esta pré-incubação em três tubos A, B e C, que continham tampão fosfato, solução salina (soro controle) e soro anti-PspA, respectivamente. Em seguida, foram montados 8 tubos, sendo que os dois primeiros eram tubos controle. Os tubos 1 e 2 receberam 50µl de tampão fosfato e os tubos de 3 a 8 receberam a mesma quantidade de solução de HNP-1 com concentração de 25µg/ml. Em seguida, foram adicionados aos tubos 1 a 4 50µl da solução pré-incubada do tubo A, aos tubos 5 e 6 50µl da solução do tubo B e aos tubos 7 e 8, 50µl da solução do tubo C.

Os cultivos foram incubados a 37 °C durante 1 hora, sem agitação. Ao término da incubação, foram submetidos à diluição seriada, em uma microplaca de diluição com solução salina PBS estéril (1x, pH=7,4) em todos os poços.

Efeito da adição de PspA recombinante na ação lítica do HNP-1

Para o ensaio de análise do efeito da adição da proteína recombinante na ação bactericida dos HNPs sobre o pneumococo, foram utilizados dois fragmentos do polissacarídeo de família 1, a proteína PspA 278 e a PspA P339, ambas produzidas pela tecnologia recombinante em *Escherichia coli* e purificadas. (FRÓES, 2019) Estes fragmentos correspondem apenas a região N-terminal da PspA, conhecida por ser a porção mais

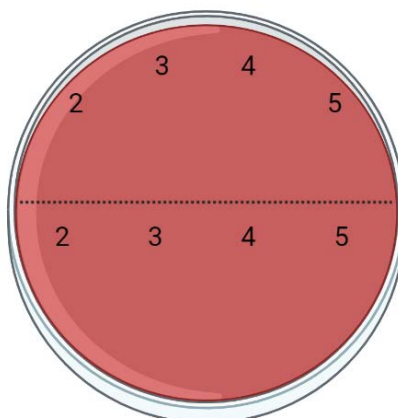
imunogênica da proteína. (GOULART, 2011)

Foram preparados 8 tubos eppendorf, 2 tubos para cada combinação, sendo 1 e 2 os tubos controle, que receberam apenas 70µl de tampão fosfato. Os tubos de 3 a 8 receberam a mesma quantidade de solução de HNP-1 em cada, com concentração de 50µg/ml. Então, foram adicionados aos tubos 3 e 4 mais 20µl de tampão fosfato, aos tubos 5 e 6 20µl de BSA (Albumina Sérica Bovina a 5µg) e aos tubos 7 e 8 20µl de rPspA. Por fim, foram adicionados em todos os tubos 30µl de bactéria lavada e ressuspensa em tampão fosfato de sódio, inclusive nos tubos controle, totalizando 100µl por tubo.

Os cultivos foram incubados a 37 °C durante 1 hora, sem agitação. Ao término da incubação, foram submetidos à diluição seriada, em uma microplaca de diluição com solução salina PBS estéril (1x, pH=7,4) em todos os poços.

Plaqueamento e Contagem

As amostras diluídas foram pipetadas em placas de ágar sangue, identificadas com o número referente ao tubo e enumerada com as concentrações 2 a 5, conforme a figura a seguir. As placas foram incubadas overnight a 37 °C, sem agitação, em jarra de anaerobiose, para posterior contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).



Created in BioRender.com bio

FIGURA 1 - Esquema de placa ágar sangue dividida em duas partes e identificada com a numeração da concentração pipetada. (Fonte: próprio autor)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas e repetidos duas vezes. Para avaliação da ação da HNP 1 sobre as cepas de pneumococos selvagens e mutantes, foi utilizado o Test Anova, com pós teste de Dunnet e significância estatística de $p \leq 0,05$. Todos os gráficos foram produzidos utilizando o programa GraphPad Prism 8.

Ensaio 1 - Efeito da PspA na ação lítica de HNPs

Inicialmente foi comparada a ação de HNP-1 sobre *S. pneumoniae* selvagem e seu mutante negativo para a expressão da proteína PspA. Para isso, as duas bactérias foram tratadas com concentrações crescentes de HNP-1 (Figura 2). A taxa de morte foi determinada como porcentagem de redução na viabilidade das bactérias, em relação ao grupo controle incubado apenas com solução tampão.

Observou-se que na menor dose, de 3 µg/mL, houve apenas uma pequena redução (na significativa) na viabilidade da estirpe mutante, enquanto a selvagem se mostrou resistente

nessa dosagem. Na bactéria selvagem, se observou uma ação dose dependente do HNP-1, iniciando inibição em 6 $\mu\text{g/mL}$, mostrando uma inibição equivalente para as duas cepas. O tratamento com HNP-1 a partir de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ já induziu uma redução significativa do número de bactérias viáveis em relação ao controle não tratado, para as bactérias selvagens e mutante PspA-negativo. No entanto, observa-se um efeito mais acentuado do peptídeo sobre a cepa mutante, nas concentrações de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e 12,5 $\mu\text{g/mL}$.

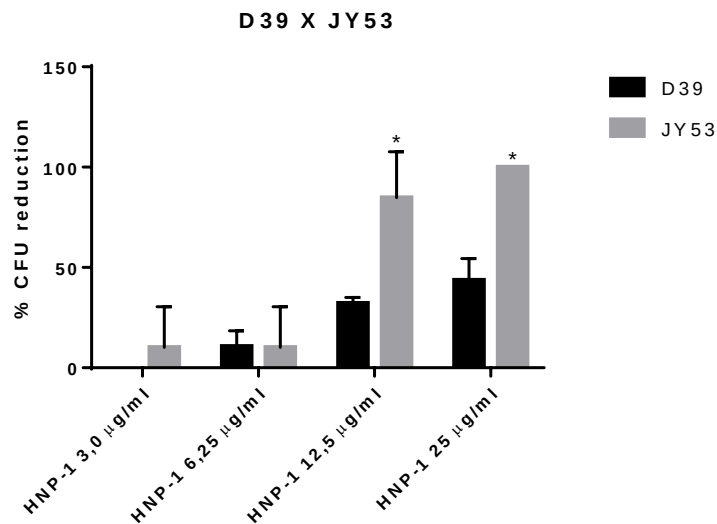


FIGURA 2. Efeito da PspA na ação bactericida do HNP-1. A estirpe D39 selvagem e seu mutante negativo para proteína de superfície de pneumococo A (PspA), JY53, foram tratados com concentrações crescentes de HNP-1, de 3 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$ e plaqueados. A redução percentual da sobrevivência bacteriana é mostrada para cada grupo e concentração em comparação com o controle não tratado. * $p < 0,05$ comparando-se bactéria selvagem e mutante em cada concentração de HNP-1.

Ensaio 2 - Efeito dos anticorpos Anti-PspA na ação lítica do HNP-1

A fim de avaliar efeito dos anticorpos Anti-PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo, foram realizados testes com dois grupos tratados com HNP-1 em uma concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, um na presença de 10% de soro de camundongos imunizados com PspA e outro com soro controle (animais injetados apenas com o adjuvante). A contagem bacteriana indicou que, para o grupo tratado com HNP-1 contendo a adição de soro anti-PspA, a viabilidade bacteriana foi menor quando comparada ao soro controle que não continha anticorpos (Figura 3).

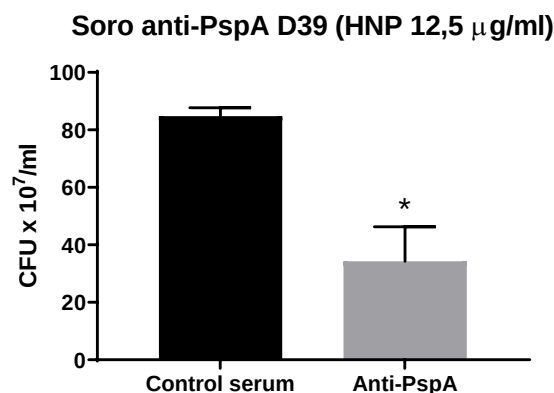


FIGURA 3. Efeito dos anticorpos Anti-PspA na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo. Foi adicionado a estirpe D39 selvagem 10 μL de soro anti-PspA245 ou 10 μL de soro controle (de animais injetados

com adjuvante em salina) e, após 15 min, os dois grupos foram tratados com HNP-1 a 12,5 µg/mL e plaqueados. O número de bactérias sobreviventes ao tratamento é mostrado para cada grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Ensaio 3 - Efeito da adição de PspA recombinante na ação lítica do HNP-1

Para avaliar se o efeito da adição de PspA recombinante poderia interferir na ação bactericida de HNP-1 sobre pneumococos selvagens, as bactérias foram tratadas com 25 µg/mL de HNP-1 mais 10 µg de PrpA recombinante (rPspA 94). A proteína rPspA 94 corresponde à porção N-terminal de uma PspA de clado 2 (família 1). A contagem bacteriana indicou que, para o grupo tratado com HNP-1 contendo a adição de PspA recombinante, a sobrevivência foi maior quando comparada à proteína controle (BSA) (Figura 3).

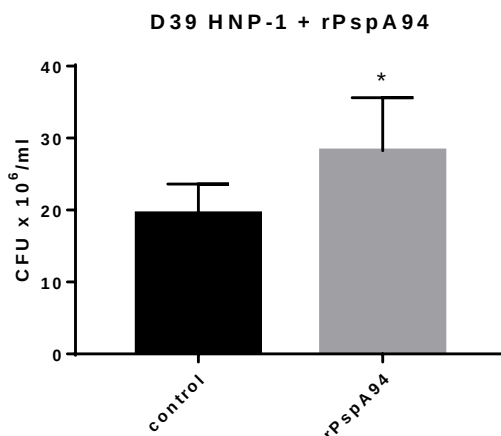


FIGURA 4. Efeito da adição de PspA recombinante na ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo. A estirpe D39 selvagem foi tratada com HNP-1 25 µg/mL mais 10 µg de rPspA94 ou 10 µg de proteína controle (BSA, control), e plaqueados. O número de bactérias sobreviventes ao tratamento é mostrado para cada grupo. Os grupos foram comparados usando o teste t de Student. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Ensaio 4 - Efeito da cápsula sobre a ação bactericida do HNP-1 sobre o pneumococo

Em seguida, foi avaliado o efeito da presença da cápsula polissacarídica na ação de HNP-1 sobre pneumococos. Para este ensaio, foram comparadas duas cepas diferentes de pneumococo, D39 sorotipo 2 e TIGR sorotipo 4, e seus mutantes isogênicos não encapsulados correspondentes. A taxa de morte foi determinada após 1 hora de incubação a 37 °C. O grupo controle foi incubado apenas com solução tampão e usado como referência para determinar a porcentagem de morte.

O resultado indicou que, para AM1001, o tratamento com HNP-1 a partir de 6,25 µg/mL já conseguiu uma redução significativa do número de bactérias viáveis em relação ao controle (Figura 5). Para 12,5 µg/mL e 25 µg/mL a redução foi ainda maior, atingindo 100%; já em sua versão selvagem houve uma progressão na taxa de mortalidade se iniciando em 6,25 µg/mL, passando por 12,5 µg/mL e chegando em 25 µg/mL. A taxa de morte pelo peptídeo se mostrou dependente da dose. Este resultado indica que, para bactéria D39, a presença da cápsula contribui para proteção contra a ação de HNP-1,

Em seguida, foi avaliada a cepa TIGR4, que produz cápsula de sorotipo 4 e seu mutante sem cápsula, HR1001. Conforme se observa na Figura 6, as cepas selvagem e mutante apresentaram resultados equivalentes.

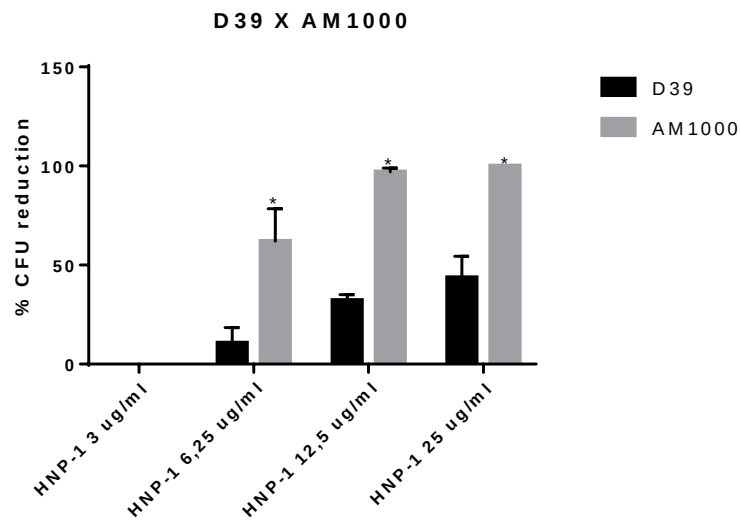


FIGURA 5. Efeito da cápsula na resistência de pneumococos ao HNP-1. A estirpe D39 selvagem e seu mutante negativo para cápsula AM10001 foram tratados com concentrações crescentes de HNP-1 a 3 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,55 µg/mL e 25 µg/mL e plaqueado. A redução percentual da sobrevivência bacteriana é mostrada para cada grupo e concentração em relação ao controle não tratado. * $p < 0,05$ comparando-se a cepa selvagem e a mutante em cada concentração de HNP-1.

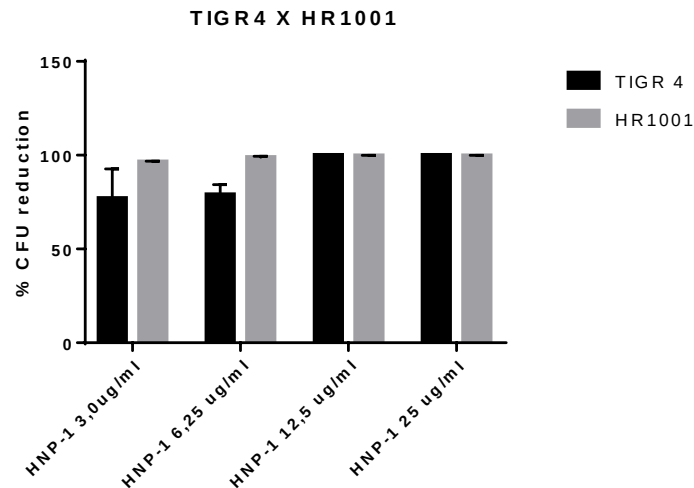


FIGURA 5. Efeito da cápsula na resistência de pneumococos ao HNP-1. A estirpe TIGR4 selvagem e seu mutante negativo para cápsula HR1001 foram tratados com concentrações crescentes de HNP-1 a 3 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,55 µg/mL e 25 µg/mL e plaqueados. A redução percentual da sobrevivência bacteriana é mostrada para cada grupo e concentração em relação ao controle não tratado.

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

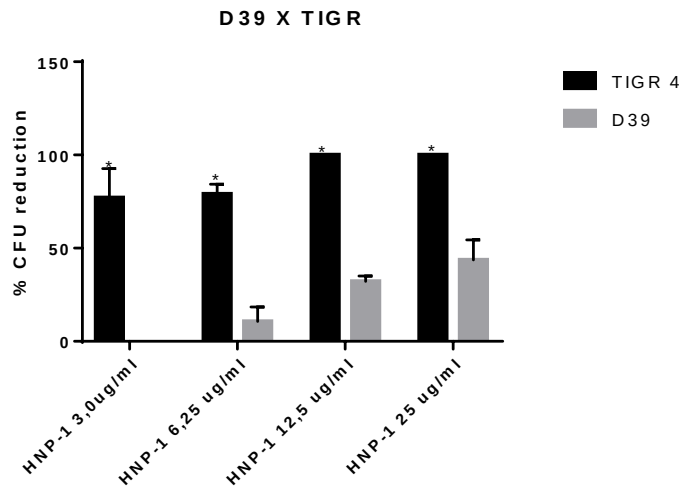


FIGURA 7. Efeito de diferentes capsulas na resistência de pneumococos ao HNP-1. Duas estirpes selvagens D39 e TIGR4 foram tratadas com concentrações crescentes de HNP-1 a 3 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,55 µg/mL e 25 µg/mL e plaqueado. A redução percentual da sobrevivência bacteriana é apresentada para cada grupo e concentração. * $p < 0,05$ em comparação com o controle.

Após encontrar resultados distintos para diferentes sorotipos capsulares, a fim de testar a relação da mudança do conteúdo capsular com a resistência bactericida ao HNP-1, as cepas selvagens D39, sorotipo 2 e TIGR4, sorotipo 4, foram comparadas quanto à resistência ao AMP (Figura 7). A cepa D39 foi mais resistente do que a TIGR4 para todas as doses avaliadas de HNP-I, onde a segunda teve redução de quase 80% com as doses mais baixas do AMP, de 3 µg/mL e 6,25 µg/mL, atingindo a totalidade em 12,5 µg/mL e 25 µg/mL.

Em resumo, os resultados indicam que a ausência de cápsula resultou em maior susceptibilidade à ação do HNP-1 no mutante de D39, AM1000 (Figura 5), mas não na mutante de TIGR4, HR1001 (Figura 6). Comparando-se a resistência à ação de HNP-1 sobre as duas cepas selvagens, observa-se que a bactéria TIGR4 é mais sensível à morte por HNP do que a cepa D39 (Figura 7).

Estudos anteriores sugerem que há interferência da PspA na ação de outros peptídeos antimicrobianos semelhantes ao HNP. Por exemplo, Fróes (2019) mostrou que a PspA é capaz de inibir a ação bactericida da indolicidina sobre o pneumococo.

Neste estudo, foi possível observar que a adição dos fragmentos de PspA recombinante livre, contendo a porção N-terminal da proteína, resgatou o pneumococo da ação lítica do HNP-1, resultando em maior sobrevivência em relação à proteína controle BSA. Este resultado apoia a hipótese de que a região N-terminal é a porção da PspA responsável pela ligação da proteína a peptídeos antimicrobianos, inclusive ao HNP, e que a adição da proteína solúvel, ou seja, não aderida à bactéria, é capaz de interferir na ação do peptídeo sobre o pneumococo. (FRÓES, 2019)

Em relação ao ensaio com adição de soro de animais imunizados com PspA, foi observado que a presença de anticorpos anti-PspA impede a ação do HNP-1 sobre o pneumococo, tornando-o mais sensível ao peptídeo. Isto indica que provavelmente o anticorpo anti-PspA se liga a proteína de superfície impossibilitando sua proteção contra a defensina,

reforçando a hipótese da PspA como fator protetivo para a bactéria contra a ação de peptídeos, como sugerido por Gatinoni (2021).

O presente estudo também avaliou a influência da cápsula polissacarídica na ação de HNP-I sobre pneumococo e verificou-se que a bactéria selvagem D39 apresenta maior resistência à ação do AMP quando comparada a sua mutante sem cápsula, AM1000. Por sua vez, a bactéria TIGR4 apresentou a mesma sensibilidade à ação de HNP-I do que a HR1001, sua mutante não encapsulada. Este resultado sugere que o papel da cápsula na ação de HNP-I varia conforme o sorotipo capsular, no entanto, outros fatores podem contribuir para o efeito protetor.

Quando comparadas as duas cepas encapsuladas, TIGR4 e D39, nota-se que a primeira foi significativamente mais sensível ao AMP do que a segunda, sugerindo que diferentes cápsulas podem afetar a ação de HNP-I de diferentes formas. Os estudos realizados por Waz (2020) apresentaram uma possível relação entre a carga da superfície bacteriana com o tipo de resposta à ação lítica dos peptídeos antimicrobianos. Segundo os dados, a cepa D39 apresenta-se altamente eletronegativa, enquanto a cepa TIGR4 apresenta o potencial próximo a neutralidade, sendo dessa maneira mais sensível à lise do peptídeo, visto que os peptídeos atuam se ligando e desestabilizando a membrana plasmática por causa do seu caráter catiônico e anfipático. (WAZ, 2020)

CONCLUSÃO

É possível afirmar que a PspA protege a bactéria da ação de HNP-1, uma vez que mutantes negativos para a proteína são mais sensíveis ao AMP. A adição de PspA recombinante aumentou o efeito protetor do pneumococo ao HNP-1, bem como a presença de anticorpos anti-PspA possibilitou a ação do HNP-1 sobre *S. pneumoniae*, devido à sua ligação com a proteína, impedindo esta de exercer sua ação protetiva.

A cepa selvagem TIGR4 foi mais sensível à ação de HNP-1 do que a cepa D39, sugerindo que a sensibilidade está relacionada ao sorotipo capsular e suas características. Mutantes não encapsulados derivados da cepa D39 (sorotipo 2), foram mais sensíveis à ação de HNP-1 do que a cepa selvagem, enquanto a TIGR4 apresentou sensibilidade semelhante à sua mutante sem cápsula.

Com base no que foi apresentado, pode-se concluir que a proteína de superfície de pneumococo A (PspA) é um importante fator protetivo presente na bactéria que atua impedindo a ligação de peptídeos antimicrobianos. Esses dados reforçam o potencial da PspA como candidato vacinal, devido à sua capacidade de induzir a produção de anticorpos que ampliam os efeitos de AMPs, como o HNP-1, e facilitam a eliminação do patógeno.

REFERÊNCIAS

- Beiter, K.; Wartha, F.; Hurwitz, R.; Normark, S.; Zychlinsky, A. and Henriques-Normark, B. **The Capsule Sensitizes *Streptococcus pneumoniae* to α -Defensins Human Neutrophil Proteins 1 to 3.** Infection And Immunity. Vol. 76, No. 8, p. 3710–3716I. Solna, Sweden, 2008.
- Converso, T. R.; Assoni, L.; Andre, G. O.; Darrieux, M. and Leite, L. C. C. **The long search for a serotype independent pneumococcal vaccine.** Expert Rev Vaccines 19(1): 57-70. 2020.
- Fróes, B. M. **Avaliação dos efeitos da indolicidina sobre *Streptococcus pneumoniae* selvagem e mutante para o gene *pspA*.** Dissertação do Programa de Pós-Graduação *Strictu sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco (USF). Bragança Paulista, 2019.
- Gatinoni, K. F. **Papel da proteína de superfície de pneumococo A (*pspA*) na ação da defensina HNP-1 sobre *Streptococcus pneumoniae*.** Dissertação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco (USF). Bragança Paulista, 2021.
- Goulart, C.; Darrieux, M.; Rodriguez, D.; Pimenta, F. C.; Brandileone, M. C.; De Andrade, A. L.; Leite, L. C. **Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells.** Vaccine, v. 29, n. 8, 2011.
- Habets, M. G. J. L.; Rozen, D. E.; Brockhurst, M. A. **Variation in *Streptococcus pneumoniae* susceptibility to human antimicrobial peptides may mediate intraspecific competition.** Proceedings of The Royal Society B, 2012. 279, 3803–381. doi:10.1098/rspb. 2012.
- Llobet, E.; Tomás, J. M. and Bengoechea, J. A. **Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides.** Microbiology (Reading, England) 154: 3877-3886.
- Rossoni, A. M. de O. **Perfil de resistência antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* isolado de pacientes com meningite bacteriana aguda na cidade de Curitiba.** Dissertação (Mestrado) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. 2003.
- Waz, N. T.; Oliveira, S.; Girardello, R.; Lincopan, N.; Barazzzone, G.; Parisotto, T.; Hakansson, A. P.; Converso, T. R. and Darrieux, M. **Influence of the Polysaccharide Capsule on the Bactericidal Activity of Indolicidin on *Streptococcus pneumoniae*.** Front. Microbiol. 13:898815. 2020

ANEXO I



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 Bertoni

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 – 30/12/2023

Número de 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



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