

RAQUEL SANTAMARIA

**Desenvolvimento e Avaliação da Resposta Imune Humoral de uma
Vacina Anti-Pneumocócica Conjugada: Polissacarídeo Capsular
Sorotipo 14 – Proteína de Superfície Pneumocócica A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2011

RAQUEL SANTAMARIA

**Desenvolvimento e Avaliação da Resposta Imune Humoral de uma
Vacina Anti-Pneumocócica Conjugada: Polissacarídeo Capsular
Sorotipo 14 – Proteína de Superfície Pneumocócica A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora:
Profa. Dra. Martha Massako Tanizaki

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Santamaria, Raquel.

Desenvolvimento e avaliação da resposta imune humoral de uma vacina anti-pneumocócica conjugada: polissacarídeo capsular sorotipo 14-proteína de superfície pneumocócica A. / Raquel Santamaria. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Martha Massako Tanizaki.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Vacinas conjugadas.

Versão do título para o inglês: Development and evaluation of the humoral immune response of an antipneumococcal conjugate vaccine: capsular polysaccharide serotype 14-pneumococcal surface protein A.

Descritores: 1. *Streptococcus pneumoniae* 2. Polissacarídeo capsular 3. Proteína de superfície pneumocócica A 4. Vacinas conjugadas 5. DMT-MM I. Tanizaki, Martha Massako

II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Butantan III. Título.

ICB/SBIB016/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Raquel Santamaria.

Título da Dissertação: Desenvolvimento e avaliação da resposta imune humoral de uma vacina anti-pneumocócica conjugada: polissacarídeo capsular sorotipo 14-proteína de superfície pneumocócica A.

Orientador(a): Martha Massako Tanizaki.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

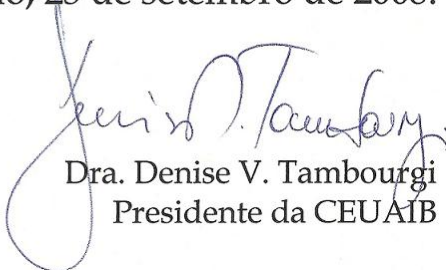
CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da viabilidade de uma vacina antipneumocócica conjugada Polissacarídeo sorotipo 14 - Proteína de superfície de pneumococo A", protocolo nº 521/08, sob a responsabilidade de Martha Massako Tanizaki e Raquel Santamaria, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **18/09/2008**.

We certify that the research entitled " Study of the viability of an antipneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 - pneumococcal surface protein A conjugate vaccine", protocol nº 521/08, under the responsibility of Martha Massako Tanizaki and Raquel Santamaria, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 09/18/2008.

Vigência do Projeto: 01/2009 – 01/2011	Nº de animais/espécie 140 fêmeas / camundongo – Balb/c
--	--

São Paulo, 23 de setembro de 2008.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, por iluminar mais uma vez o meu caminho e permitir esta grande conquista em minha vida. À minha mãe, que sempre me incentivou a estudar, a qual devo, em grande parte, o que hoje sou. Aos meus amigos, pela grande força, apoio, incentivo e paciência, além dos indispensáveis momentos de reflexão e descontração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida e por proporcionar-me a conclusão de mais uma etapa da mesma, a qual se consuma na realização deste trabalho, pois sem Ele nada seria possível.

À minha mãe e familiares por todos os ensinamentos, carinho, apoio, compreensão e dedicação durante todos os anos da minha vida.

Aos meus amigos pelo apoio e incentivo que nunca faltaram.

À Martha, por este ato de confiança, pelos ensinamentos e dedicação durante estes anos de orientação.

À Giovana, Cátia, Giuliana, Maysa, Rogéria e Miriam pelo convívio, companheirismo, apoio e ensinamentos ao longo destes anos. A ajuda e força dispensadas por vocês foram essenciais para a execução deste trabalho.

À Cibelly e Dúnia, pela participação e auxílio constantes nos ensaios imunológicos.

À Carol e Ao Giovani do Biotério pela boa disposição e cuidados com os camundongos, assim como pelo apoio e auxílio nos dias de imunização e, principalmente, nos dias de sangria.

Aos funcionários e demais alunos do Centro de Biotecnologia pela ajuda e bom humor sempre, assim como pelos momentos de descontração.

À Eliane, Fábria e Marcos da Secretaria de Pós-Graduação pelos serviços prestados.

À CAPES pelo financiamento deste trabalho.

*“O cavalo prepara-se para
o dia da batalha, mas do
Senhor vem a vitória.”*

Provérbios 21:31

RESUMO

SANTAMARIA, R. **Desenvolvimento e Avaliação da Resposta Imune Humoral de uma Vacina Anti-Pneumocócica Conjugada: Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14 – Proteína de Superfície Pneumocócica A.** 2011. 143 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva encapsulada que coloniza assintomaticamente a nasofaringe, sendo uma das principais causas de morte por pneumonia e meningite em crianças e idosos. As vacinas contra *S. pneumoniae* são compostas por polissacarídeos capsulares (PS) livres ou conjugados à uma proteína. A vantagem do polissacarídeo conjugado em relação ao livre é a resposta timo-dependente. Pelo fato de existirem pelo menos 92 diferentes sorotipos capsulares, a utilização de uma proteína pneumocócica em uma vacina conjugada com apenas alguns sorotipos poderia aumentar a sua cobertura vacinal. Para tal, a utilização da proteína de superfície pneumocócica A (PspA) foi utilizada como carreador protéico covalentemente ligado ao polissacarídeo capsular sorotipo 14. Este trabalho também apresenta uma nova metodologia para a síntese de vacinas conjugadas, que vem demonstrando melhores resultados em nosso laboratório em comparação aos métodos clássicos de conjugação. A síntese do conjugado PS14-PspA resultou em alto grau de polimerização com formação de gel. Para evitar este problema, os grupos ϵ -amino da lisina da PspA foram modificados com formaldeído na presença de cianoborohidreto de sódio. Desta forma, a polimerização entre moléculas de PspA pôde ser reduzida. Anticorpos contra a PspA modificada foram capazes de se ligar na superfície da bactéria e induzirem um perfil de deposição de complemento similar ao dos anticorpos contra a PspA nativa. O índice de avidéz também foi o mesmo para ambos. O conjugado foi administrado em camundongos BALB/c e o título de IgG anti-PS14 e anti-PspA, assim como o índice de avidéz, a deposição de complemento e a distribuição das subclasses de IgG anti-PS14 e anti-PspA foram avaliados. O título de IgG anti-PS14 conjugado foi significativamente maior do que título de IgG anti-PS14 livre. A avidéz e a deposição de complemento do soro anti-PS14 conjugado também foram maiores. A principal subclasse de IgG induzida pelo PS14 livre foi IgG3 enquanto o PS14 conjugado induziu preferencialmente IgG1. No entanto, o índice de avidéz, o perfil de distribuição das subclasses de IgG e a medida funcional da atividade opsonofagocítica dos soros anti-PspA livre e conjugada foram os mesmos. Não obstante, houve maior deposição de complemento na superfície de *S. pneumoniae* na presença do soro anti-PspA conjugada em comparação ao soro anti-PspA livre.

Palavras-chave: *Streptococcus pneumoniae*. Polissacarídeo capsular. Proteína de superfície pneumocócica A. Vacinas conjugadas. DMT-MM.

ABSTRACT

SANTAMARIA, R. **Development and Evaluation of the Humoral Immune Response of an Antipneumococcal Conjugate Vaccine: Capsular Polysaccharide Serotype 14 – Pneumococcal Surface Protein A.** 2011. 143 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Streptococcus pneumoniae is an encapsulated Gram-positive bacterium that colonizes asymptotically the nasopharynx, being one of the leading causes of death from pneumonia and meningitis in infants and elderly. Vaccines against *S. pneumoniae* are constituted by plain capsular polysaccharide (PS) or conjugated to a protein. The advantage of conjugated PS on plain PS vaccine is the thymus dependent immune response. Since there are at least 92 different capsular serotypes, the use of a pneumococcal protein in a conjugate vaccine using only few serotypes might broaden its coverage. For this purpose the pneumococcal surface protein A (PspA) was used as protein carrier to bind covalently to the capsular polysaccharide serotype 14. This work also presents a new methodology for the synthesis of conjugate vaccines, which showed better results in our laboratory in comparison to the classic ones. The synthesis of the conjugate PS14-PspA resulted in a high degree of polymerization with gel formation. To avoid polymerization, lysine ϵ -amino groups of PspA were modified by reaction with formaldehyde in the presence of sodium cyanoborohydrate. Thus, polymerization between PspA molecules could be reduced. Antibodies against modified PspA were able to bind at bacterium surface and to induce complement deposition in a similar profile than antibodies against control PspA. The avidity index of both was also the same. The conjugate was injected in BALB/c mice and sera were measured for IgG titer against PS14 and PspA. IgG avidity index, complement deposition, and anti-PS14 and anti-PspA IgG subclasses were also evaluated. IgG titer against conjugated PS14 was significantly higher than IgG titer against control PS14. The avidity and the complement deposition of conjugated anti-PS14 serum were also higher. The main IgG subclass induced by free PS14 was IgG3 while conjugated PS14 induced preferably IgG1. Nevertheless, the avidity index, the IgG subclasses distribution profile, and the functional opsonophagocytic measure from free and conjugated anti-PspA sera were the same. However, higher complement deposition occurred on *S. pneumoniae* surface in the presence of conjugated anti-PspA serum than in the unconjugated anti-PspA serum.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*. Capsular Polysaccharide. Pneumococcal Surface Protein A. Conjugate Vaccines. DMT-MM.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH – Dihidrazida do Ácido Adípico

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Al(OH)₃ – Hidróxido de Alumínio

APC – Célula Apresentadora de Antígenos

ATCC – *The American Type Culture Collection*

BCA – Ácido Bicinchonínico

BSA – Albumina Bovina Sérica

CbpA – Proteína de Ligação à Colina

CDR – Região Definidora de Clado

ChoP – Fosfocolina

CNBr – Brometo de Cianogênio

ConA – Concanavalina A

CR – Receptor do Complemento

CRM₁₉₇ – Variante Mutada da Toxina Diftérica

DMT-MM – Cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino

DO – Densidade Óptica

DPI – Doença Pneumocócica Invasiva

DT – Toxóide Diftérico

E. coli – *Escherichia coli*

EDAC – Hidrocloro de 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil carbodiimida

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

Eno – Enolase

EUA – Estados Unidos da América

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

g – grama

GAVI – *The Global Alliance for Vaccines and Immunization*

H. influenzae – *Haemophilus influenzae*

HCl – Ácido Clorídrico
H₂SO₄ – Ácido Sulfúrico
Hyl – Hialuronidase
IA – Índice de Avidéz
IgA – Imunoglobulina A
IgA1 – Imunoglobulina A Subclasse 1
IgA2 – Imunoglobulina A Subclasse 2
IgAs – Imunoglobulina A Secretora
IgM – Imunoglobulina M
IgG – Imunoglobulina G
IgG1 – Imunoglobulina G Subclasse 1
IgG2a – Imunoglobulina G Subclasse 2a
IgG2b – Imunoglobulina G Subclasse 2b
IgG3 – Imunoglobulina G Subclasse 3
IgG4 – Imunoglobulina G Subclasse 4
Il-1 – Interleucina 1
kDa - kilodáton
KSCN – Tiocianato de Potássio
LPS - Lipopolissacrídeo
LytA – Autolisina
µg - micrograma
µL - microlitro
µM - micromol
M - Molar
mg – miligrama
mM – milimolar
MAC – Complexo de Ataque à Membrana
MEC – Matriz Extracelular

MHCII – Complexo de Histocompatibilidade de Classe II

nm – nanômetro

NaBH₄ – Borohidreto de Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaCNBH₃ – Cianoborohidreto de Sódio

NaIO₄ – Meta-periodato de Sódio

NanA – Neuraminidase A

NaOH – Hidróxido de Sódio

(NH₄)₂SO₄ – Sulfato de Amônio

N. meningitidis – *Neisseria meningitidis*

OMA – Otite Média Aguda

OMS – Organização Mundial de Saúde

OMV – Vesícula de membrana externa de *Neisseria meningitidis*

OPD - Orto-fenildiamina

PavA – Fator de virulência e aderência A

PavB – Fator de virulência e aderência B

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PBS-T – Tampão Fosfato-Salino acrescido de Tween 20 à 0,05%

pIgR – Receptor Polimérico de Imunoglobulina

Ply – Pneumolisina

PMEN – *Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*

PMNs – Leucócitos Polimorfonucleares

PNI – Programa Nacional de Imunização

PS – Polissacarídeo Capsular

PS14 – Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14

PS14hid – Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14 hidrolisado

PS14oxi – Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14 oxidado

PS14-ADH – Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14 derivatizado com ADH

PS14-ADH-rPspA3mod / PS14-rPspA3mod / PS14-rPspA3 – Conjugado obtido entre o Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14 derivatizado com ADH e a Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 3 recombinante modificada com formaldeído.

PsaA – Antígeno de Superfície Pneumocócica A

PspA – Proteína de Superfície Pneumocócica A

PspA1 – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 1

PspA2 – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 2

PspA3 – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 3

PspA4 – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 4

PspA5 – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 5

PspC – Proteína de Superfície Pneumocócica C

rPspA3 – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 3 recombinante

rPspA3mod – Proteína de Superfície Pneumocócica A do clado 3 recombinante modificada com formaldeído

RPM – Rotações por minuto

SNC – Sistema Nervoso Central

S. pneumoniae – *Streptococcus pneumoniae*

SpsA – Proteína Secretora de Superfície Pneumocócica A

TD – Antígeno Timo Dependente

Th1 – Célula T auxiliar Tipo 1

Th2 – Célula T auxiliar Tipo 2

THY – Meio Todd-Hewitt acrescido de extrato de levedura à 0,5%

TI-2 – Antígeno Timo Independente do tipo 2

TNBS – Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TT – Toxóide Tetânico

UFC – Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: COBERTURA DA DOENÇA PNEUMOCÓCICA INVASIVA FORNECIDA PELAS VACINAS 7-, 10- E 13-VALENTE, RESPECTIVAMENTE.....	38
FIGURA 2: TAXA DA INCIDÊNCIA DE DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS PARA CADA 100.000 CRIANÇAS ABAIXO DE 5 ANOS DE IDADE.....	46
FIGURA 3: TAXA DE MORTALIDADE POR DOENÇAS PNEUMOCÓCICAS PARA CADA 100.000 CRIANÇAS ABAIXO DE 5 ANOS DE IDADE.....	47
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DO NÚMERO DE MORTES POR PNEUMONIA EM CRIANÇAS ABAIXO DE 5 ANOS DE IDADE	48
FIGURA 5: TAXA DE DPI DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA ANTES E APÓS A INTRODUÇÃO DA VACINA CONJUGADA 7-VALENTE NOS EUA	50
FIGURA 6: PERFIL GLOBAL DE INTRODUÇÃO DA VACINA 7-VALENTE CONJUGADA	54
FIGURA 7: PAÍSES ELEGIDOS PELA ALIANÇA GAVI E ANO DE INTRODUÇÃO DA VACINA 7-VALENTE CONJUGADA	55
FIGURA 8: SUBUNIDADE DE POLISSACARÍDEO CAPSULAR SOROTIPO 14.....	60
FIGURA 9: ESQUEMA DAS POSSÍVEIS INTERAÇÕES ENTRE A PSPA E OUTRAS MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DE <i>S. PNEUMONIAE</i>	69
FIGURA 10: ESQUEMA DOS DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DA PSPA.....	70
FIGURA 11: SUBUNIDADE DE POLISSACARÍDEO CAPSULAR SOROTIPO 14 E SUAS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS SUSCETÍVEIS À RUPTURA POR HIDRÓLISE ÁCIDA DESTACADAS EM VERMELHO.....	89
FIGURA 12: CROMATOGRAMA DO PS14 NATIVO E HIDROLISADO EM RESINA SEPHACRYL S-400	90
FIGURA 13: PERFIL ELETROFORÉTICO DA RPSPA3 NATIVA E MODIFICADA.....	95
FIGURA 14: CROMATOGRAMA DO PS14-ADH E DA RPSPA3MOD LIVRES EM RESINA PHENYL SEPHAROSE 6FF (HIGH SUB).....	97
FIGURA 15: CROMATOGRAMA DO CONJUGADO PS14-RPSPA3 EM RESINA PHENYL SEPHAROSE 6FF (HIGH SUB).....	98

FIGURA 16: SUBUNIDADES DOS POLISSACARÍDEOS CAPSULARES SOROTIPOS 14 E 6B..	100
FIGURA 17: TÍTULO DE IgG ANTI-PS14 NO SORO DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM O CONJUGADO PS14-RPSPA3 E GRUPOS CONTROLE	101
FIGURA 18: TÍTULO DE IgG ANTI-RPSPA3 NO SORO DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS COM O CONJUGADO PS14-RPSPA3 E GRUPOS CONTROLE	102
FIGURA 19: DEPOSIÇÃO DE C3 NA SUPERFÍCIE DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> NA PRESENÇA DE SORO ANTI-PS14	104
FIGURA 20: DEPOSIÇÃO DE C3 NA SUPERFÍCIE DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> NA PRESENÇA DE SORO ANTI-RPSPA3	106
FIGURA 21: PERFIL DAS SUBCLASSES DE IgG INDUZIDAS PELO PS14 LIVRE E CONJUGADO À RPSPA3	110
FIGURA 22: PERFIL DAS SUBCLASSES DE IgG INDUZIDAS PELA RPSPA3 LIVRE E CONJUGADA AO PS14	112
FIGURA 23: ENSAIO OPSONOFAGOCÍTICO NA PRESENÇA DE SORO ANTI-RPSPA3 LIVRE E CONJUGADA.....	115

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: ESQUEMA DO MÉTODO DE CONJUGAÇÃO QUÍMICA VIA AMINAÇÃO REDUTIVA.....	40
ESQUEMA 2: ESQUEMA DO MÉTODO DE CONJUGAÇÃO QUÍMICA BROMETO DE CIANOGENÍO.....	40
ESQUEMA 3: ESQUEMA DO MÉTODO DE CONJUGAÇÃO QUÍMICA PARA FORMAÇÃO DE OXIMAS.....	42
ESQUEMA 4: ESQUEMA DA VARIANTE DO MÉTODO DE CONJUGAÇÃO QUÍMICA VIA AMINAÇÃO REDUTIVA.....	43
ESQUEMA 5: ESQUEMA DO MÉTODO DE CONJUGAÇÃO QUÍMICA UTILIZADO NESTE TRABALHO.....	44
ESQUEMA 6: ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE CONJUGAÇÃO PROMOVIDA PELA ATIVAÇÃO DO GRUPAMENTO CARBOXILA DE PROTEÍNAS POR EDAC.....	45
ESQUEMA 7: ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE CONJUGAÇÃO PROMOVIDA PELA ATIVAÇÃO DO GRUPAMENTO CARBOXILA DE PROTEÍNAS POR DMT-MM.....	45
ESQUEMA 8: ILUSTRAÇÃO DAS ETAPAS REACIONAIS PARA OBTENÇÃO DO CONJUGADO PS14-RPSPA3.....	79
ESQUEMA 9: CRONOGRAMA DO ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS BALB/C COM O CONJUGADO PS14-RPSPA3.....	82
ESQUEMA 10: ESQUEMA GERAL DE OXIDAÇÃO DO PS14.....	91
ESQUEMA 11: (A) ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO COM HIDRAZIDAS. (B) ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO DO PS OXIDADO COM ADH.....	92
ESQUEMA 13: ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE PROTEÇÃO DOS GRUPOS ϵ-AMINO DA RPSPA3 POR AMINAÇÃO REDUTIVA COM FORMALDEÍDO E NACNBH_3.....	94
ESQUEMA 14: RESÍDUO DE LISINA DA RPSPA3 N-ALQUILADO POR AMINAÇÃO REDUTIVA COM FORMALDEÍDO E NACNBH_3.....	94
ESQUEMA 15: POLIMERIZAÇÃO DA RPSPA3 NATIVA NA PRESENÇA DE FORMALDEÍDO.....	96

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PERFIL DAS VACINAS CONJUGADAS LICENCIADAS ATÉ O PRESENTE MOMENTO.....	37
TABELA 2 – ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO COM O CONJUGADO PS14-RPSPA3 E SEUS RESPECTIVOS GRUPOS CONTROLE	82
TABELA 3 – PROPRIEDADES E DISTRIBUIÇÃO DAS SUBCLASSES DE IGG EM ADULTOS.	107
TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS GERAIS DA RESPOSTA IMUNE CONTRA DIFERENTES ANTÍGENOS.....	108

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE	21
1.1.1 O MICRORGANISMO	21
1.1.2 COLONIZAÇÃO E FATORES DE RISCO	22
1.1.3 MECANISMOS DE PATOGÊNESE	23
1.1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	26
1.1.5 VACINAS ANTI-PNEUMOCÓCICAS: RESPOSTA IMUNE PROTETORA	32
1.1.6 MÉTODOS DE CONJUGAÇÃO QUÍMICA PARA OBTENÇÃO DE VACINAS	39
1.2 EPIDEMIOLOGIA	46
1.2.1 PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA DOENÇA PNEUMOCÓCICA	46
1.2.2 PROGRAMAS DE VIGILÂNCIA E DISTRIBUIÇÃO DOS SOROTIPOS PNEUMOCÓCICOS	51
1.2.3 PERFIL DA RESISTÊNCIA PNEUMOCÓCICA	55
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA	59
1.3.1 CÁPSULA POLISSACARÍDICA	59
1.3.1.1 <i>POLISSACARÍDEO CAPSULAR SOROTIPO 14</i>	59
1.3.2 NEURAMINIDASE (NANA)	60
1.3.3 HIALURONIDASE (HYL)	61
1.3.4 IGA PROTEASE	61
1.3.5 PNEUMOLISINA (PLY)	63
1.3.6 PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE PNEUMOCÓCICA	63
1.3.6.1 <i>AUTOLISINA (LYTA)</i>	64
1.3.6.2 <i>ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE PNEUMOCÓCICA A (PSAA)</i>	65
1.3.6.3 <i>ADESINAS DE SUPERFÍCIE PNEUMOCÓCICA</i>	66
1.3.6.4 <i>PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE PNEUMOCÓCICA C (PSPC)</i>	66
1.3.6.5 <i>PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE PNEUMOCÓCICA A (PSPA)</i>	67
2 JUSTIFICATIVA	73

3 OBJETIVOS.....	74
3.1 GERAIS.....	74
3.2 ESPECÍFICOS.....	74
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
4.1 REAGENTES	75
4.2 CEPAS BACTERIANAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	75
4.3 ATIVAÇÃO DO PS14	75
4.3.1 HIDRÓLISE	75
4.3.2 OXIDAÇÃO.....	76
4.3.3 DERIVATIZAÇÃO	77
4.4 RPSPA3	78
4.4.1 MODIFICAÇÃO DA RPSPA3 NATIVA	78
4.5 CONJUGAÇÃO DO PS14-ADH COM A RPSPA3MOD	78
4.6 PURIFICAÇÃO DO CONJUGADO PS14-RPSPA3	79
4.6.1 CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA (CIH)	79
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	79
4.7.1 QUANTIFICAÇÃO DE POLISSACARÍDEO	79
4.7.1.1 MÉTODO FENOL-SULFÚRICO	79
4.7.2 QUANTIFICAÇÃO DE ALDEÍDO E DE RPSPA3.....	80
4.7.2.1 MÉTODO BCA.....	80
4.7.3 QUANTIFICAÇÃO DE ADH E GRUPOS ϵ -AMINO DA RPSPA3.....	81
4.7.3.1 MÉTODO TNBS.....	81
4.8 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL INDUZIDA PELO PS14-RPSPA3	81
4.8.1 ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO	81
4.8.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ANTICORPOS	82
4.8.2.1 TITULAÇÃO DE IGG ANTI-PS14 POR ELISA	82
4.8.2.2 TITULAÇÃO DE IGG ANTI-RPSPA3 POR ELISA	83
4.8.3 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE AVIDEZ.....	84

4.8.4 ISOTIPAGEM DE ANTICORPOS	84
4.8.4.1 DETERMINAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IGG ANTI-PS14	84
4.8.4.2 DETERMINAÇÃO DAS SUBCLASSES DE IGG ANTI-RPSPA3.....	85
4.8.5 DEPOSIÇÃO DE COMPLEMENTO	86
4.8.6 OPSONOFAGOCITOSE	87
4.8.6.1 MEDIDA DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE IGG ANTI-RPSPA3.....	87
4.8.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	88
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.1 ATIVAÇÃO DO PS14.....	89
5.1.1 HIDRÓLISE	89
5.1.2 DOSAGEM DE GRUPOS AMINO NO PS HIDROLISADO.....	90
5.1.3 OXIDAÇÃO	90
5.1.4 DERIVATIZAÇÃO	92
5.2 RPSPA3	93
5.2.1 MODIFICAÇÃO DA RPSPA3 NATIVA	93
5.3 CONJUGAÇÃO DO PS14-ADH COM A RPSPA3MOD	96
5.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL INDUZIDA PELO PS14-RPSPA3	100
5.4.1 AVALIAÇÃO DO TÍTULO DE IGG ANTI-PS14 E ANTI-RPSPA3	100
5.4.2 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE AVIDEZ	102
5.4.3 DEPOSIÇÃO DE COMPLEMENTO.....	103
5.4.4 ISOTIPAGEM DE ANTICORPOS ANTI-PS14 E ANTI-RPSPA3	106
5.4.4.1 ANÁLISE DAS SUBCLASSES DE IGG ANTI-PS14	109
5.4.4.2 ANÁLISE DAS SUBCLASSES DE IGG ANTI-RPSPA3.....	111
5.4.5 OPSONOFAGOCITOSE	114
5.4.5.1 ANÁLISE DA MEDIDA DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE IGG ANTI-RPSPA3.....	114
6 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS	119
ANEXO A – CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR	142

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus pneumoniae*

1.1.1 O Microrganismo

Streptococcus pneumoniae, também conhecido como pneumococo, é uma bactéria Gram-positiva, encapsulada, anaeróbia facultativa e que cresce aos pares, apresentando morfologia de diplococos lanceolados ou cadeias curtas (DOWSON, 2004; KIM; WEISER, 1998; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A superfície do pneumococo consiste de três estruturas distintas: membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica.

A membrana plasmática apresenta uma estrutura conservada, sendo composta por uma bicamada lipídica com proteínas e moléculas de ácido lipoteicóico – contendo resíduos de fosfocolina (ChoP) – inseridas (DOWSON, 2004; KIM; WEISER, 1998).

A parede celular é composta por polissacarídeos e grandes quantidades de ácido teicóico ancorando diversas proteínas de superfície. O ácido teicóico – conhecido como polissacarídeo C – também contém resíduos de colina e é ligado ao peptidoglicano de sua superfície externa, sendo este o principal fator responsável pela intensa resposta inflamatória gerada no hospedeiro durante a infecção por pneumococo através da ativação da via alternativa do sistema complemento e da produção de citocinas. Já a cápsula polissacarídica, que é a estrutura mais externa, não produz resposta inflamatória (DOWSON, 2004; KIM; WEISER, 1998; TONNAER et al., 2006).

As cápsulas podem variar em tamanho e composição, sendo a base da diferenciação sorológica do pneumococo em pelo menos 92 sorotipos, constituindo o seu principal fator de virulência. Elas protegem o pneumococo contra a fagocitose interferindo na ligação do fator C3b do complemento à superfície bacteriana ou mascarando o reconhecimento do fragmento C3b ligado por receptores do complemento (CR) em fagócitos (DOWSON, 2004; HYAMS et al., 2010; KIM; WEISER, 1998; MALLEY, 2010).

De forma alternativa, a cápsula também inibe o reconhecimento de antígenos de superfície por IgG específica, prevenindo a via clássica de ativação do

complemento. Portanto, a cápsula permite a sobrevivência e proliferação do pneumococo nos tecidos (DOWSON, 2004; HYAMS et al., 2010; KIM; WEISER, 1998; TONNAER et al., 2006).

1.1.2 Colonização e Fatores de Risco

O pneumococo coloniza assintomaticamente a nasofaringe, sendo uma das maiores causas de infecções do trato respiratório como a pneumonia e infecções invasivas (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004; BRICKS, 1994; ECHÁNIZ-AVILÉS; SOLÓRZANO-SANTOS, 2001; KADIOGLU et al., 2008; SERRANO; MELO-CRISTINO; RAMIREZ, 2006; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Um número significativo de pessoas são colonizadas por pneumococos no trato respiratório, sendo que estas podem ser colonizadas simultaneamente por múltiplos sorotipos. Os principais fatores que influenciam a taxa de colonização nos portadores incluem: idade abaixo de dois anos, número de irmãos e condições de aglomerações, ou seja, condições de vida em pequenas áreas, particularmente em creches (MALFROOT et al., 2004; MATO et al., 2005).

A taxa de colonização pneumocócica aumenta até os dois anos, decrescendo significativamente com o aumento da idade e se eleva novamente em idades mais avançadas (DAGAN et al., 1998; HAUSDORFF et al., 2000).

Desta forma, a colonização pneumocócica pode ser detectada na primeira infância, com pico de incidência durante os primeiros três anos de vida, onde tem sido demonstrado que crianças de até 2 meses de idade e adultos de 18 a 50 anos são os grupos com a menor taxa de colonização nasofaríngea (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004; DAGAN et al., 1998). Portanto, pode-se inferir que a idade é um importante fator de risco para colonização pneumocócica e que a sua influência varia de acordo com a fase de crescimento ao longo da vida. De forma semelhante, a distribuição dos sorotipos pneumocócicos também pode variar de acordo com a região geográfica, o tempo e a apresentação clínica dos pacientes, onde a população negra, índios americanos e nativos do Alasca, indivíduos tabagistas, alcoolistas ou com condições médicas crônicas como diabetes, doença falciforme, doenças cardíacas, pulmonares e renais, doenças imunossupressoras, particularmente a AIDS, também fazem parte do grupo de risco (BEREZIN et al., 2007; CARDOZO et al., 2008; DAGAN; LIPSITCH, 2004; RUBINS et al., 1998).

Devido ao fato da doença pneumocócica ser menos freqüente em adolescentes, a colonização por pneumococo nesta população não tem sido explorada em profundidade (MACKENZIE et al., 2010). Entre adultos a taxa de colonização varia de acordo com a convivência com crianças (HENDLEY et al., 1975).

No Brasil, a taxa de colonização pneumocócica em crianças de 8 a 71 meses varia de 21,2-55%, onde na população total foi relatada uma prevalência de colonização pneumocócica de 19-43% (CARDOZO et al., 2008).

Embora a colonização da nasofaringe possa ou não resultar em doença, a nasofaringe é o principal reservatório para a transmissão entre famílias, em creches e na comunidade. Portanto, a propagação pessoa-pessoa do pneumococo ocorre através do contato direto com secreções de indivíduos colonizados e, desta forma, o carregamento do pneumococo é um fator crítico para a sua transmissão horizontal (DAGAN, 2009; FARIA; FARHAT, 1999; HAUSDORFF et al., 2000; O'BRIEN; SANTOSHAM, 2004).

A colonização da mucosa nasofaríngea determina, então, um estado transitório de portador assintomático do agente infeccioso, podendo ser intermitente ou persistir de semanas a meses. Embora alguns sorotipos colonizem a nasofaringe por períodos prolongados, a infecção invasiva é decorrente apenas da aquisição recente de sorotipos mais virulentos (GRAY; CONVERSE III; DILLON JR, 1980; HAUSDORFF et al., 2000; JOHNSTON JR, 1991).

As infecções pneumocócicas ocorrem durante todo o ano, com maior freqüência no inverno devido a fatores predisponentes como viroses e aumento da poluição atmosférica (BALDY, 2005).

1.1.3 Mecanismos de Patogênese

Na nasofaringe, as defesas locais do hospedeiro são representadas pela atividade ciliar do epitélio respiratório e pela presença local de IgA secretora (FARIA; FARHAT, 1999).

O pneumococo pode causar tanto doenças a nível de mucosa (não invasivas) como doenças invasivas quando há o seu isolamento de locais habitualmente estéreis como sangue, líquido encéfalo-raquidiano, pleural ou sinovial. Dentre as doenças não invasivas estão a otite aguda no ouvido médio ou otite média aguda

(OMA), sinusite, conjuntivite, bronquite e pneumonia. Já entre as doenças pneumocócicas invasivas (DPI) estão a pneumonia bacterêmica, meningite, empiema, peritonite, artrite, osteomielite, bacteremia e sepse (BRICKS; BEREZIN, 2006).

A patogênese da infecção pneumocócica envolve, então, inicialmente a colonização da nasofaringe, seguida por sua disseminação pelo ouvido médio, sino, trato respiratório inferior e, em alguns casos, invasão da corrente sanguínea.

A colonização pneumocócica é dependente da aderência do pneumococo ao epitélio do trato respiratório. O pneumococo interage com pelo menos quatro carboidratos distintos da célula hospedeira, entre eles, a N-acetil-glicosamina, onde a variação na capacidade de diferentes isolados no reconhecimento destes carboidratos varia de acordo com a sua capacidade invasiva. Sendo assim, a prevalência de sorotipos específicos deve-se, em parte, ao grau de expressão e conformação de adesinas pneumocócicas de superfície que permitem o reconhecimento e a adesão à célula hospedeira. Estas proteínas de superfície contribuem para as características hidrofóbica e eletrostática da superfície do pneumococo e, por isso, facilitam, em parte, a sua aderência por interações físico-químicas inespecíficas (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004; GARCÍA-RODRIGUEZ; MARTINEZ, 2002; NOVAK; TUOMANEN, 1999; TUOMANEN, 1997).

Para invadir a mucosa de forma efetiva, a bactéria deve transpassar a IgA secretora e os mecanismos de “*clearance*” ciliar da mucosa nasofaríngea para, então, ligar-se à porção apical da célula e, assim, atravessar a membrana basolateral do epitélio. O pneumococo produz uma protease que cliva a IgA secretora, facilitando a sua adesão à célula epitelial. A invasão requer a produção de fatores inflamatórios, como interleucina-1 (Il-1) e fator de necrose tumoral (TNF). Portanto, durante a multiplicação das células pneumocócicas, componentes de parede celular são liberados favorecendo a invasão por promoverem estímulo para produção de citocinas por células do hospedeiro. Essas citocinas alteram o número e o tipo de receptores nas células epiteliais e endoteliais alterando, também, a afinidade de colinas presentes na parede celular do pneumococo por esses receptores promovendo, então, a migração transcelular através do epitélio respiratório e endotélio vascular, resultando no acesso da bactéria à circulação (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004; GARCÍA-RODRIGUEZ; MARTINEZ, 2002; TUOMANEN, 1997).

A proliferação e migração das bactérias aderidas pelas vias aéreas acometem cavidades adjacentes, instalando quadros de otite média aguda, sinusites e, quando microaspiradas, surgem as pneumonias. Também podem acometer outros órgãos por contigüidade, mais comumente gerando pleurites e meningites. A progressão para pneumonia se dá pela fagocitose ineficiente, permitindo a multiplicação do pneumococo nos alvéolos e a liberação de citocinas no fluido broncoalveolar, enquanto a meningite e outras doenças invasivas como endocardite, artrite, osteomielite e peritonites resultam da disseminação hematogênica (FEDSON; MUSER; ESKOLA, 1999; BALDY, 2005).

Portanto, três vias de entrada de bactérias ao sistema nervoso central (SNC) são descritas: por inoculação direta, por contigüidade de estruturas adjacentes ou por via hematogênica. Esta última é a mais comum e o ponto de entrada é o trato respiratório superior. Na nasofaringe a bactéria passa por cinco etapas até atingir o SNC: fixação e colonização, invasão da corrente sangüínea, sobrevivência e multiplicação no sangue, passagem através da barreira hemato-encefálica, sobrevivência e multiplicação do microrganismo no líquido (HINRICHSEN, 2005).

A adaptação do pneumococo aos diferentes nichos ecológicos do hospedeiro é um mecanismo determinante para a sua virulência. Essa habilidade de sobrevivência em diferentes locais é conferida pela regulação da quantidade de cápsula e moléculas de superfície produzidas por um processo denominado variação de fase, refletindo em alterações na morfologia da colônia (MORONA; MORONA; PATON, 2006; WEISER et al., 1994).

Desta forma, os tipos morfológicos do pneumococo resultantes deste processo podem ser transparentes ou opacos. O fenótipo transparente apresenta cápsula delgada, elevados níveis de colina e de proteína de superfície pneumocócica C (PspC) sendo, portanto, mais eficiente na colonização da superfície mucosa da nasofaringe, enquanto o fenótipo opaco é mais virulento em infecções sistêmicas, onde há requerimento de expressão máxima de cápsula polissacarídica, que inibe a opsonização mediada pelo complemento, sendo capaz de sobreviver na corrente sangüínea. Os fatores que provocam a variação de fase ainda não foram completamente elucidados, porém é sabido que os padrões de expressão de alguns genes são contrários nas variantes opacas e transparentes (HAMMERSCHMIDT et al., 2005; MAGEE; YOTHER, 2001).

Em resumo, a fisiopatogenia da doença pneumocócica depende fortemente da resposta inflamatória induzida pelos peptídeoglicanos e ácido teicóico da parede bacteriana. Essas estruturas são responsáveis pela intensa resposta inflamatória que acompanha a infecção pneumocócica, uma vez que estimulam o influxo de células inflamatórias, ativam a produção de citocinas e a cascata do complemento. Esses fenômenos ocorrem independentemente da bactéria encontrar-se viva. A inadequada modulação dessa resposta pelo organismo explica a persistência da alta taxa de letalidade da doença, mesmo com os avanços tecnológicos alcançados na terapêutica (QUAGLIARELLO; SHIELD, 1992; BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004).

O complemento é um dos componentes essenciais na imunidade do hospedeiro na eliminação de pneumococos invasivos. No entanto, o pneumococo desenvolveu estratégias de proteção a fim de limitar o ataque pelo complemento. Entre elas: cápsula polissacarídica, pneumolisina e proteínas de superfície pneumocócica. Não obstante, futuras elucidações do mecanismo de evasão do complemento são importantes para o melhor entendimento da patogênese da doença (SABHARWAL et al., 2009).

1.1.4 Características Gerais da Resposta Imunológica contra *Streptococcus pneumoniae*

A resposta imune humoral (RIH) é mediada por anticorpos secretados que atuam na defesa contra microrganismos extracelulares como as bactérias extracelulares, fungos e vírus liberados mediante lise da célula (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

No entanto, a eliminação de antígenos mediada por anticorpos envolve mecanismos efetores que requerem a participação de vários componentes humorais e celulares, incluindo proteínas do complemento e fagócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

O sistema complemento é um dos principais mecanismos efetores da imunidade humoral. Esse sistema consiste em proteínas séricas e de superfície celular que interagem umas com as outras e com outras moléculas do sistema imunológico de uma maneira altamente regulada para gerar produtos que eliminem

microrganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; BROWN et al., 2002; DELVES et al., 2006).

Portanto, as principais funções efetoras do sistema complemento na imunidade natural e humoral específica são promover a fagocitose de microrganismos nos quais o complemento está ativado, estimular a inflamação e induzir a lise celular destes microrganismos, tendo uma particular importância na defesa do hospedeiro contra bactérias encapsuladas, a qual é mediada inteiramente pela imunidade humoral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

O sistema complemento pode ser ativado por três cascatas enzimáticas: a alternativa, a clássica e a das lectinas (BROWN et al., 2002).

A *via alternativa* de ativação do complemento é ativada na superfície de microrganismos na ausência de anticorpos e, portanto, faz parte da imunidade inata. É iniciada pela clivagem da proteína plasmática C3 gerando C3a e C3b. Desta forma, ocorre a exposição de uma ponte tioéster pela mudança conformacional do domínio tioéster presente em C3 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

O fragmento C3b se liga a grupamentos amino ou hidroxilas presentes em microrganismos formando ligações amida ou éster. Na ausência de microrganismos, C3b é hidrolisado na fase fluida. Em seguida, a proteína plasmática fator B liga-se ao C3 previamente ligado e sofre clivagem por uma serino-protease plasmática denominada fator D, gerando Ba e Bb, onde o último permanece ligado à C3b. O complexo C3bBb é a C3 convertase da via alternativa, que cliva mais moléculas de C3 amplificando a ativação do complemento quando ela é iniciada pelas demais vias. A properdina estabiliza a C3 convertase nas superfícies microbianas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

No entanto, quando este complexo é formado na célula hospedeira, ele é rapidamente degradado por proteínas reguladoras ausentes em microrganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

Algumas moléculas de C3b geradas pela C3 convertase desta via se ligam à mesma, gerando a C5 convertase desta via (C3bBbC3b) que, por sua vez, cliva C5 iniciando as etapas tardias da ativação do complemento (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

As etapas tardias da ativação do complemento consistem nos eventos subseqüentes gerados pela formação das C5 convertases, sendo estes iguais para

todas as vias de ativação do complemento. Portanto, as C5 convertases geradas pelas três vias de ativação do complemento iniciam a ativação dos últimos componentes do complemento que culminam na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

O C5 é clivado em C5a e C5b, onde o último permanece ligado às proteínas do complemento depositadas na superfície celular. O C5b liga C6 e C7 e o complexo C5b,6,7 hidrofóbico se insere na bicamada lipídica, tornando-se um receptor de alta afinidade para C8. O complexo C5b-8 inserido de forma estável na bicamada possui capacidade limitada de lisar células. Ao ligar C9, ocorre a formação de um MAC completamente ativo, resultando na formação de poros nos microrganismos, levando-os à morte (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

No entanto, por ser uma bactéria Gram-positiva e apresentar uma parede celular espessa, o pneumococo não está sujeito à lise direta pelo sistema complemento através do complexo de ataque à membrana (DOWSON, 2004).

Desta forma, a principal função do sistema complemento nas infecções pneumocócicas está relacionada à opsonização e destruição por macrófagos e neutrófilos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DOWSON, 2004).

A *via clássica* de ativação do complemento é ativada pela ligação da proteína C1q com a porção Fc dos isótipos IgM e IgG quando ligados a antígenos, ou seja, pela ligação de C1q à complexos antígeno-anticorpo em superfícies bacterianas, sendo considerada como mecanismo efetor predominante da resposta imune adquirida, enquanto as demais vias são ativadas diretamente por componentes da superfície bacteriana, sendo considerados como mecanismos efetores da resposta imune inata (BROWN et al., 2002).

No entanto, a via clássica também pode ser ativada durante a imunidade inata através da IgM natural. Anticorpos IgM naturais contra o polissacarídeo C (ácido teicóico) da parede celular de *S. pneumoniae* têm sido bem descritos, sendo estes necessários na imunidade contra *S. pneumoniae* (BROWN et al., 2002).

Em alguns casos, a via clássica também pode ser ativada na ausência de anticorpos, onde macrófagos da zona marginal expressando SIGN-R1 (lectina de superfície do tipo C) se ligam à polissacarídeos na superfície de alguns patógenos como, por exemplo, o *S. pneumoniae* (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006; KANG et al., 2006).

O componente C1 é um complexo protéico multimérico composto pelas subunidades C1q, C1r e C1s. Ele se liga aos domínios C_H3 de IgM e C_H2 de IgG. Sendo assim, C1q se liga ao anticorpo, onde cada molécula de C1q deve se ligar à duas cadeias pesadas de IgG para ser ativada. Desta forma, apenas IgG ligada à antígenos (e não IgG livre na circulação) pode iniciar a ativação desta via. Como cada molécula de IgG possui apenas uma região Fc, múltiplas moléculas de IgG devem estar reunidas para que o C1q possa se ligar (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

A ligação de C1q à IgM ou IgG leva a ativação da serino-protease C1r, a qual ativa C1s. A subunidade C1s ativada cliva C4 para gerar C4b (que possui uma ponte tioéster interna homóloga à de C3b) formando ligações covalentes com o complexo antígeno-anticorpo ou à superfície adjacente do microrganismo em que o anticorpo está ligado. Em seguida, a proteína C2 se liga à C4b e é clivada pelo C1s gerando C2a e C2b, onde o primeiro permanece ligado. O complexo C4bC2a é a C3 convertase desta via. O C3b pode formar pontes covalentes com os antígenos nos quais a ativação foi iniciada, gerando a C5 convertase da via clássica e iniciando as últimas etapas da ativação do complemento ou com superfícies celulares ligando-se ao fator B e formando C3 convertase pela via alternativa, onde uma única C3 convertase pode levar à deposição de milhares de C3b à microrganismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

A *via das lectinas* de ativação do complemento faz parte da imunidade inata, sendo baseada no reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), como a manose, peptídeoglicanos e lipopolissacarídeo (LPS). Esses carboidratos são reconhecidos por ficolinas e colectinas, que são os iniciadores desta via (BROUWER et al., 2008).

Uma das colectinas é a lectina ligadora de manose (MBL). A MBL é uma proteína do soro do sistema imune inato que depende de cálcio produzido no fígado durante a resposta de fase aguda em infecções. É uma lectina solúvel e possui homologia estrutural e funcional ao C1q, o primeiro componente da via clássica do sistema complemento (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; BROUWER et al., 2008; DELVES et al., 2006; ROY et al., 2002; VAN EMMERIK et al., 1994).

A função da MBL na defesa do hospedeiro consiste na sua ligação à serino-proteases associadas, denominadas (MASPs), levando à ativação da cascata do sistema complemento independentemente da presença de anticorpos, resultando na

clivagem de C3. O C3 clivado na superfície de microrganismos medeia a opsonização e a posterior remoção do mesmo. As serino-proteases associadas à MBL são denominadas MASP-1, MASP-2 e MASP-3, onde MASP2 e MASP3 formam um complexo semelhante à C1r e C1s e MASP-2 cliva os componentes C4 e C2 subsequentes (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; BROUWER et al., 2008; DELVES et al., 2006; ROY et al., 2002; VAN EMMERIK et al., 1994).

A MBL se liga à vários patógenos clinicamente relevantes, onde a sua capacidade de se ligar com alta afinidade à resíduos de N-acetil-glicosamina e manose presentes na superfície de várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e partículas de levedura têm sido relatada (BROUWER et al., 2008; ROY et al., 2002).

A MBL liga-se fortemente à espécies de *Candida*, *Aspergillus fumigatus*, *Staphylococcus aureus* e estreptococos do grupo A, enquanto uma ligação intermediária têm sido relatada para *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Haemophilus influenzae tipo b*. Em contraste, a MBL liga-se fracamente à estreptococos do grupo B como *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus epidermis* (BROUWER et al., 2008; ROY et al., 2002). Desta forma, a MBL é fracamente associada com infecções por *S. pneumoniae* (KANG et al., 2006).

Não obstante, estudos sobre a associação entre deficiências na via das lectinas e DPI foram realizados, onde portadores de genótipos deficientes de MBL foram associados com DPI gerada por sorotipos pouco invasivos (VALLÈS et al., 2010).

Já é bem sabido que a capacidade do pneumococo de causar doenças invasivas é altamente dependente do sorotipo capsular, onde a prevalência dos sorotipos entre os casos de DPI varia muito de acordo com a idade e a região geográfica. Desta forma, a capacidade de evasão de sorotipos altamente invasivos dos mecanismos de opsonofagocitose pode ser a principal estratégia utilizada por estes microrganismos, já que os sorotipos pouco invasivos, de forma contrária, necessitam de fatores predisponentes do hospedeiro (tais como deficiência de MBL) para causarem doença (VALLÈS et al., 2010).

A deficiência de MBL é mais proeminente em crianças, cujo sistema imunológico ainda é imaturo. Este dado pode explicar o fato de que as crianças com deficiência de MBL são suscetíveis à infecção por sorotipos pouco invasivos, os denominados sorotipos pediátricos – 6A/6B, 14, 19F e 23F (VALLÈS et al., 2010).

Em resumo, cada via de ativação do complemento induz a clivagem de C3, formando fragmentos que se ligam aos microrganismos, agindo como opsoninas e facilitando a remoção de patógenos através do seu reconhecimento por leucócitos. Portanto, o passo fundamental nas três vias de ativação do complemento é a formação da C3 convertase, catalisando a proteólise do componente C3 (BROUWER et al., 2008; KANG et al., 2006).

A C3 convertase primeiramente gera C3b que é posteriormente clivado para C3bi e C3d. Tanto C3b como C3bi e C3d agem como opsoninas para receptores de fagócitos (KANG et al., 2006).

No entanto, o componente C4b da via clássica e das lectinas, assim como a MBL e as imunoglobulinas IgG e IgA também se apresentam como moléculas coadjuvantes da fagocitose (DELVES et al., 2006).

Embora os fagócitos expressem uma variedade de receptores de superfície que se ligam diretamente aos microrganismos, proporcionando um mecanismo de imunidade natural, a eficiência da fagocitose se torna bastante acentuada se o fagócito puder se ligar à uma partícula a qual tenha alta afinidade, a opsonina (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DOWSON, 2004).

A opsonofagocitose, portanto, constitui um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra pneumococos invasivos, onde pacientes com deficiências tanto dos componentes iniciais da via clássica (C1q e C2) como de C3 possuem alto risco de apresentarem doença pneumocócica. Portanto, apenas a via alternativa e a via clássica conferem resistência contra a infecção por *S. pneumoniae*. Porém, alguns estudos mostram que a via clássica parece ser mais importante do que a via alternativa para a fagocitose do pneumococo, onde camundongos deficientes em C1q, o primeiro componente da via clássica, apresentaram maior suscetibilidade à infecção do que os camundongos com deficiência de fator B, um componente central da via alternativa (BROWN et al., 2002; KANG et al., 2006; SABHARWAL et al., 2009; YUSTE et al., 2008).

Além disso, estudos anteriores mostraram que a fagocitose de *S. pneumoniae* também é dependente de complemento (GORDON et al., 2000; MATTHAY et al., 1981) e que a deficiência de C1q em camundongos infectados por via intravenosa prejudica o “clearance” do pneumococo no sangue, que é dependente da fagocitose (BROWN et al., 2002).

Portanto, a fagocitose eficiente requer que a atividade do complemento esteja intacta no soro, já que C1q exógeno é capaz de restaurar a fagocitose em soros deficientes em C1q, sugerindo fortemente que a ausência da via clássica é responsável pela diminuição da fagocitose nestes soros (YUSTE et al., 2008).

Estes estudos sugerem que o complemento é o componente mais importante do soro na indução da fagocitose, onde resultados de opsonização com soro termicamente tratado, com anticorpos preservados, mas sem a atividade de complemento foi apenas ligeiramente superior ao observado com apenas tampão de Hank, sugerindo que quaisquer efeitos de anticorpos sejam mediados através da atividade da via clássica ao invés de interações diretas com receptores Fcγ em fagócitos (YUSTE et al., 2008). No entanto, apesar da importância do complemento, ele se mostrou ineficiente na opsonização de pneumococos na ausência de anticorpo, mostrando a necessidade tanto de anticorpos específicos como de complemento na opsonização de *S. pneumoniae* (MATTHAY et al., 1981).

Nesse contexto, a proteção contra doenças pneumocócicas é conferida pela produção de anticorpos sorotipo-específicos contra a cápsula, que agem como opsoninas, aumentando a fagocitose pela via clássica e determinando a morte da bactéria (BRICKS, 1994).

1.1.5 Vacinas Anti-Pneumocócicas: Resposta Imune Protetora

A vacinação na prevenção contra infecções por *S. pneumoniae*, principalmente em indivíduos de risco, tem sido adotada em alguns países.

Em países em que a incidência de infecções por *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* tem decrescido drasticamente pela introdução de vacinas, *S. pneumoniae* tem se tornado a principal causa de infecções invasivas em crianças (BOGAERT et al., 2004). Desta forma, a vacinação como política de saúde pública é a principal e mais efetiva medida na prevenção de doenças e mortes, além de contribuir com a redução de gastos em hospitalização (ECHÁNIZ-AVILÉS; SOLÓRZANO-SANTOS, 2001).

As vacinas anti-pneumocócicas disponíveis são baseadas em polissacarídeos capsulares livres ou conjugados a uma proteína carreadora.

Em 1977, foi introduzida a primeira vacina anti-pneumocócica polivalente para uso comercial, sendo esta composta pelos 14 sorotipos de polissacarídeos

capsulares livres prevalentes nos Estados Unidos (EUA) e em alguns países da Europa. Em 1983, esta vacina foi substituída por uma formulação 23-valente, utilizada até os dias atuais sob os nomes de Pneumovax 23 (Merck Sharp & Dohme, Whitehouse Station, N.J., EUA) e Pneumo 23 (Sanofi Pasteur SA, Lyon, França). Composta pelos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, que representam de 85-90% dos sorotipos responsáveis pela doença invasiva nos EUA e pouco mais de 80% no Brasil, apresenta uma cobertura de até 90% contra pneumonia, meningite e bacteremia em adultos jovens nos EUA, onde acima de dois anos de idade, esta vacina apresenta eficácia de 56-81% na prevenção de DPI (BRICKS, 1994; BUTLER et al., 1993; FEDSON; MUSHER; ESKOLA, 1999).

No entanto, os polissacarídeos são baixamente imunogênicos em indivíduos do grupo de risco, principalmente em crianças menores de dois anos de idade (BOGAERT et al., 2004; POLAND, 1999; VLIEGENTHART, 2006).

Os polissacarídeos ativam diretamente células B, induzindo a síntese de anticorpos independentemente de células T (BAKER, 1992; KÄYHTY; KARANKI; MÄKELÄ, 1984). Como consequência, induzem níveis variáveis de anticorpos, sendo predominantemente IgM apresentando, também, baixa afinidade. Essas vacinas não induzem memória imunológica, necessitando de revacinação periódica. Além disso, a proteção desta vacina raramente é alcançada contra as infecções pneumocócicas não invasivas tais como a otite média aguda (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

Diferentemente dos polissacarídeos, as proteínas são quebradas em peptídeos e associadas com o complexo de histocompatibilidade de classe II (MHCII) na superfície da célula e, então, apresentadas às células T para estimular a produção de anticorpos pelas células B. Desta forma, através da conjugação química do polissacarídeo à uma proteína, o polissacarídeo pouco imunogênico adquire a característica imunogênica da proteína, sendo reconhecido pelo sistema imune como T-dependente (ECHÁNIZ-AVILÉS; SOLÓRZANO-SANTOS, 2001).

Portanto, a vacina conjugada induz imunidade regular contra DPI e, em certa medida, contra doenças não invasivas, inclusive em crianças, induzindo imunidade em mucosas e memória imunológica (WHO, 2003).

Tanto com a vacina polissacarídica como com a vacina conjugada, a duração da imunidade protetora não é bem definida, mas em adultos saudáveis, a vacina

polissacarídica é capaz de oferecer proteção por pelo menos cinco anos. Já em crianças saudáveis, a proteção conferida pela vacina conjugada pode durar muito mais tempo (WHO, 2003).

Neste contexto, polissacarídeos capsulares conjugados à proteínas como o toxóide tetânico (TT), toxóide diftérico (DT), variante mutada da toxina diftérica (CRM₁₉₇) e vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* (OMV) são utilizados como antígenos vacinais contra *H. influenzae* tipo b, *N. meningitidis* e *S. pneumoniae*.

Portanto, o desenvolvimento de vacinas anti-pneumocócicas conjugadas foi baseado nas técnicas de conjugação utilizadas para o *H. influenzae* tipo b, que foi a primeira vacina conjugada comercializada (GOLD et al., 1975).

A primeira vacina heptavalente anti-pneumocócica conjugada (PNCRM7, PCV7-CRM, Prevenar 7[®] ou PCV7[®] – Wyeth Pharmaceuticals, Madison, N.J., EUA), composta pelos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F conjugados à CRM₁₉₇, foi licenciada em 2000 nos EUA e em 2001 no Brasil com resultados promissores para doença invasiva, pneumonia severa e otite média sorotipo-específicas em crianças menores de 2 anos (ECHÁNIZ-AVILÉS; SOLÓRZANO-SANTOS, 2001; MORETTI et al., 2007). Esta vacina também cobre o sorotipo 6A por reação cruzada (MANTESE et al., 2009).

Portanto, a incorporação da vacina conjugada 7-valente em programas nacionais de imunização (PNI), diminuiu a mortalidade pneumocócica em crianças vacinadas, assim como em adultos através da imunidade indireta, incluindo infecções causadas por cepas resistentes (FRANCO et al., 2010).

Devido a notória efetividade desta vacina, a Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza a sua inclusão nos programas nacionais de imunização, especialmente em países onde a mortalidade entre crianças menores de 5 anos de idade é maior que 50/1.000 nascidos vivos ou quando mais de 50.000 crianças morrem anualmente (WHO, 2007).

No entanto, diversos estudos demonstraram que nos países onde foram feitos um amplo programa de vacinação, está sendo relatada a mudança do perfil de prevalência e, até mesmo, o surgimento de novos sorotipos patogênicos onde, atualmente, o sorotipo 19A tem se tornado altamente significativo nos EUA após a introdução da vacina conjugada 7-valente. De forma semelhante, a importância do sorotipo 19A também vem sendo relatada no Brasil, o que deve ser levado em conta

na introdução de uma vacina conjugada no país (CASTAÑEDA et al., 2009; FRANCO et al., 2010; FUKUYAMA et al., 2010; MANTESE et al., 2009).

Na época de introdução da vacina conjugada 7-valente, ela apresentava uma cobertura de 80-90% nos EUA, Canadá e Austrália. Na Europa e África, a cobertura fornecida por esta vacina era de aproximadamente 70-75% ao passo que essa vacina atingia aproximadamente 50% de cobertura na Ásia e 71.9% ou 72.1% (incluindo o sorotipo 6A) no Brasil. No entanto, atualmente, estudos já evidenciam que a cobertura da vacina conjugada 7-valente para a população brasileira caiu para 57,9% (MANTESE et al., 2009).

Portanto, outras formulações baseadas em polissacarídeos conjugados utilizando números variáveis de antígenos, assim como diferentes proteínas carreadoras também estão sendo avaliadas como, por exemplo, a vacina 10-valente (Synflorix™ ou PHiD-CV – Glaxo Smith Kline Biologicals, Brentford, Middlesex, Inglaterra) e a vacina 13-valente (Prevenar 13®, PCV13-CRM ou PCV13® – Wyeth Pharmaceuticals) (CHOO; FINN, 2001; DAGAN et al., 2002; DE STEFANO; PFEIFER; NOHYNEK, 2008; DE SCHUTTER et al., 2006; FORSGREN; RIESBECK; JANSON, 2008; KLUGMAN et al., 2003).

No Brasil, a Synflorix™ que apresenta em sua composição oito dos seus sorotipos (1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 23F) conjugados com a proteína D de *H. influenzae* NT, um sorotipo conjugado ao toxóide diftérico (19F) e um sorotipo conjugado ao toxóide tetânico (18C) foi licenciada no ano de 2009, onde o governo federal firmou uma parceria de transferência de tecnologia com a empresa inglesa Glaxo Smith Kline Biologicals (GSK Bio) para a produção da mesma no Brasil, afirmando ser muito importante que os laboratórios nacionais dominem a moderna tecnologia para obtenção de vacinas conjugadas (BRASIL, 2010; WYSOCKI et al., 2009).

A fabricação será realizada pelo Laboratório Biomanguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), onde a implantação desta vacina no calendário básico de vacinação a fim de atender todas as crianças na faixa de 2-6 meses de idade está prevista para o ano de 2011 (BRASIL, 2010). No entanto, a vacina já se encontra disponível em clínicas particulares e chega a custar em torno de R\$300.

É importante ressaltar que é necessário que o esquema completo seja realizado para que se obtenha a proteção esperada pela vacinação. O indicado é que as doses sejam administradas nos seguintes esquemas (EUROPEAN MEDICINE AGENCY, 2009):

Lactentes de 6 semanas até 6 meses: 3 doses com intervalos de pelo menos um mês entre elas. É recomendada uma dose de reforço pelo menos 6 meses após a última dose da primo-imunização e, preferencialmente, entre os 12 e 15 meses de idade (EMEA, 2009);

Lactentes entre 7 e 11 meses: 2 doses com intervalo de um mês entre elas e uma terceira dose de reforço entre 12 e 15 meses de idade. A dose de reforço deve ter intervalo mínimo de 2 meses em relação à segunda dose (EMEA, 2009);

Lactentes entre 12 e 23 meses: 2 doses com intervalo de 2 meses entre elas. Não foi estabelecida a necessidade de uma dose de reforço após este esquema de imunização (EMEA, 2009).

Dados da OMS sugerem que a mudança da vacina conjugada 7-valente para a vacina 10-valente aumentaria a cobertura vacinal de 86% para 88% nos EUA e de 74% para 84% na Europa. Nos países em desenvolvimento, esse aumento seria de aproximadamente 67% para 81% na África, 43% para 66% em algumas regiões da Ásia e de 60% para 80% no Brasil (RAMAKRISHNAN; FOREMAN, 2008a; WHO, 2007).

A vacina 13-valente (PCV13[®]) também foi licenciada no ano de 2009 no Brasil e apresenta os sorotipos 3, 6A e 19A adicionais à Synflorix[™]. Nos EUA esta vacina passou a substituir a PCV7[®] em fevereiro de 2010, não havendo tempo sequer para introdução da vacina 10-valente neste país devido à rápida emergência do sorotipo 19A (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

A PCV13[®] apresenta imunogenicidade, segurança e tolerabilidade de forma similar à PCV7[®] e surgiu para suprir um aumento de doença invasiva de 0,8 para 2,5 casos por 100.000 pessoas que houve entre os anos de 1998 e 2005 por sorotipos não supridos pela PCV7[®], especialmente pelo sorotipo 19A (BRYANT et al., 2010).

Em 2000, antes da introdução da vacina conjugada 7-valente, sete sorotipos – 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F e 23F – representavam os pneumococos resistentes à antibióticos. Atualmente, a maior parte da resistência é hoje encontrada no sorotipo 19A, incluso apenas na PCV13[®]. Conseqüentemente, entre crianças menores de 5 anos de idade, esta vacina confere proteção contra aproximadamente 97% da DPI por isolados não suscetíveis à penicilina (CASTAÑEDA et al., 2009; CDC, 2010).

Além disso, um estudo farmacoeconômico realizado com a PCV7[®], a Synflorix[™] e a PCV13[®], mostrou que além da PCV13[®] diminuir de forma mais efetiva os casos de doença invasiva, pneumonia, otite média e bacteremia, como

conseqüência, ela também gera menores gastos para os serviços de saúde, sendo a vacina conjugada anti-pneumocócica mais promissora até o presente momento (CHUCK et al., 2010).

A vacina conjugada 13-valente aumentaria de forma significativa a cobertura dos sorotipos que colonizam a nasofaringe no Brasil em relação à vacina conjugada 7-valente (aumento de aproximadamente 60 para 90%) (RAMAKRISHNAN; FOREMAN, 2008a; WHO, 2007). No entanto, no Brasil a PCV13[®] só se encontra disponível no setor privado de saúde.

A **Tabela 1** mostra o perfil das vacinas conjugadas licenciadas até o presente momento, enquanto a **Figura 1** mostra a cobertura proporcionada pelas mesmas até o ano de 2008.

Tabela 1 – Perfil das Vacinas Conjugadas licenciadas até o presente momento. Os sorotipos adicionais das formulações sucessoras à PCV7[®] encontram-se destacados em vermelho.

Vacinas	Sorotipos	Carreadores Protéicos
PCV7-CRM (Prevenar 7 [®])	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F	CRM197
PHiD-CV (Synflorix TM)	1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	Mistura de Toxóides Tetânico e Diftérico e Proteína D de <i>H.influenzae</i>
PCV13-CRM (Prevenar 13 [®])	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F	CRM197

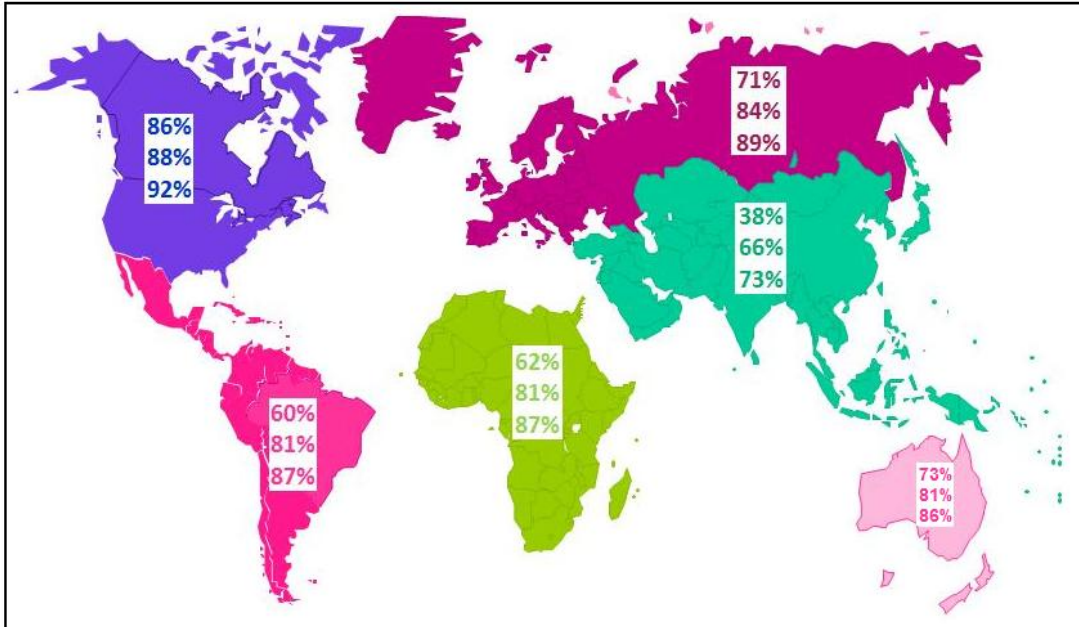


Figura 1: Cobertura da doença pneumocócica invasiva fornecida pelas vacinas 7-, 10- e 13-valente, respectivamente.

Fonte: Adaptado de Ramakrishnan e Foreman (2008a).

Não obstante, estudos mais recentes indicam que a cobertura atual fornecida pela vacina conjugada 13-valente no Brasil já caiu para 72% (FRANCO et al., 2010; MANTESE et al., 2009).

Em março de 2010, a *Merck Research Laboratories* anunciou no 7º simpósio internacional de doenças pneumocócicas a sua nova vacina conjugada 15-valente (PCV15®) contendo os sorotipos 22F e 33F adicionais à PCV13®. Essa vacina ainda se encontra em fase de teste.

Portanto, além das dificuldades técnicas de se incluir diversos sorotipos em uma única formulação de vacina conjugada encarecendo, também, o seu custo e inviabilizando cada vez mais a sua utilização em países em desenvolvimento, pode ser observado que, mundialmente, a população está sendo sujeita a uma pressão seletiva por uma vacina altamente imunogênica, a vacina conjugada 7-valente (CASTAÑEDA et al., 2009; MANTESE et al., 2009).

Além disso, todas as vacinas conjugadas disponíveis no mercado (anti-hemófilus, anti-meningocócicas ou anti-pneumocócicas) têm como base as mesmas proteínas carreadoras: toxóide tetânico (TT), toxóide diftérico (DT) ou a variante mutada da toxina diftérica (CRM₁₉₇) e vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* (OMV). Tal fato implica no surgimento de uma nova preocupação em relação à vacinas multivalentes utilizando o mesmo carreador protéico que é a

indução de tolerância imunológica e conseqüente redução da resposta imune contra o polissacarídeo. Desta forma, novas formulações que utilizem outros carreadores protéicos tornam-se necessárias tanto para o desenvolvimento de esquemas pediátricos de vacinação e combinações vacinais, assim como para impedir o fenômeno de substituição (DAGAN; POOLMAN; SIEGRIST, 2010).

Sendo assim, a utilização de uma proteína pneumocócica de superfície com capacidade de induzir uma resposta imune cruzada como, por exemplo, a proteína de superfície pneumocócica A (PspA), na tentativa de aumentar tanto a indução dos níveis de IgG anti-PS como o espectro de cobertura vacinal induzido pelo conjugado, pelo fato de estar presente em todos os isolados pneumocócicos, torna-se uma alternativa atraente para o desenvolvimento de novas vacinas conjugadas contra *S. pneumoniae*.

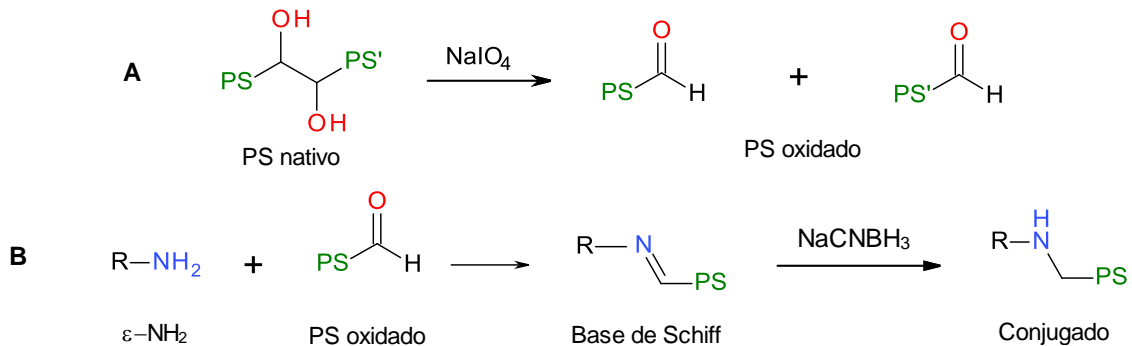
1.1.6 Métodos de Conjugação Química para Obtenção de Vacinas

A grande dificuldade das vacinas conjugadas, principalmente para o pneumococo, onde existe um grande número de sorotipos patogênicos, está no processo de conjugação química, um processo constituído de várias etapas reacionais, onde o rendimento final é raramente superior a 20% (FRASCH, 2009).

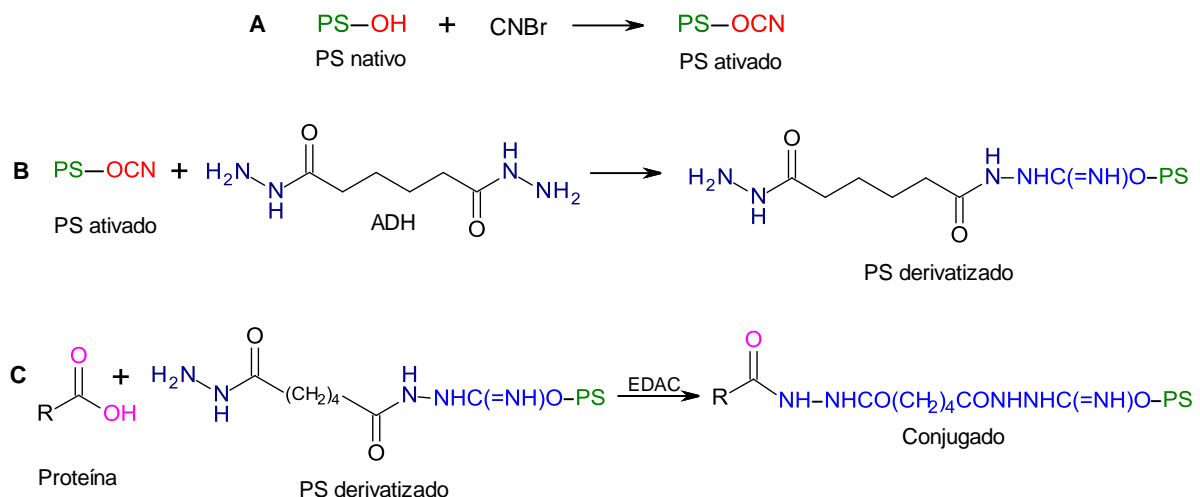
Além disso, tanto o processo como o rendimento de conjugação química variam de acordo com os diferentes sorotipos capsulares e, desta forma, são necessários métodos específicos para cada sorotipo capsular com o intuito de maximizar tanto o rendimento de conjugação química, como a resposta imune induzida pelo conjugado (LAFERRIÈRE et al., 1997).

Atualmente, a maioria das vacinas conjugadas disponíveis no mercado são produzidas por dois métodos de conjugação química já bem descritos. Um deles é o *Método da Aminoação Redutiva (Esquema 1)*, onde as hidroxilas vicinais do PS são oxidadas à aldeído que, por sua vez, reagem diretamente com o grupamento amina da proteína a ser conjugada, como nos casos da vacina MCC[®] (anti-meningocócica C conjugada à CRM₁₉₇) e da PCV7[®]. O outro método mais comumente empregado é o *Método do Brometo de Cianogênio (CNBr) (Esquema 2)*, onde as hidroxilas vicinais do PS são ativadas por CNBr que, por sua vez, são reagidos com espaçadores como a dihidrazida do ácido adípico (ADH), que reagem com o grupamento carboxila da proteína na presença de uma molécula intermediária, a

carbodiimida EDAC [hidrocloreto de (1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etil-carbodiimida)], como é o caso da vacina Hiberix[®] (PS de *H. influenzae* tipo b conjugado ao toxóide tetânico) (LAFERRIÈRE et al., 1997; SCHNEERSON et al., 1986).

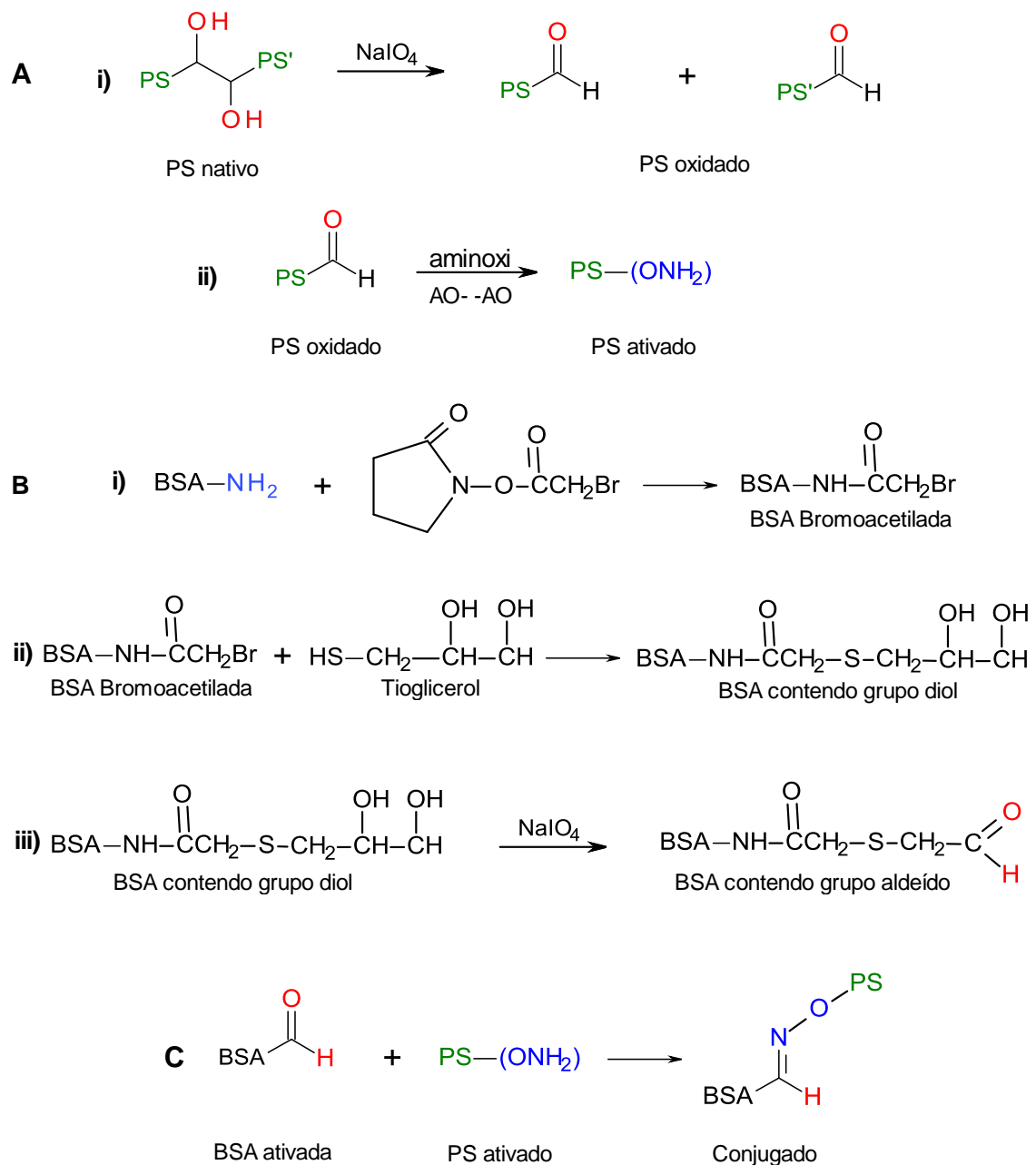


Esquema 1: Esquema do Método de Conjugação Química via Aminoação Redutiva. **(A)** Esquema representativo da oxidação das hidroxilas vicinais do PS com conseqüente formação de grupos aldeídos e ruptura da ligação carbono-carbono. **(B)** Conjugação química entre o grupo ϵ -amino de lisinas protéicas e o PS oxidado via aminoação redutiva. Neste método, o grupo ϵ -amino protéico reage o grupo aldeído presente no PS formando uma dupla ligação C=N instável (base de Schiff), que é posteriormente reduzida por NaCNBH₃, levando à formação do conjugado. Fonte: Adaptado de Morrison e Boyd (2005).



Esquema 2: Esquema do Método de Conjugação Química Brometo de Cianogênio. **(A)** Ativação do PS com CNBr. **(B)** Derivatização do PS ativado com o ADH e **(C)** Reação do PS-ADH com o grupo carboxila da proteína na presença do ativador EDAC, levando à formação do conjugado. Fonte: Adaptado de Morrison e Boyd (2005).

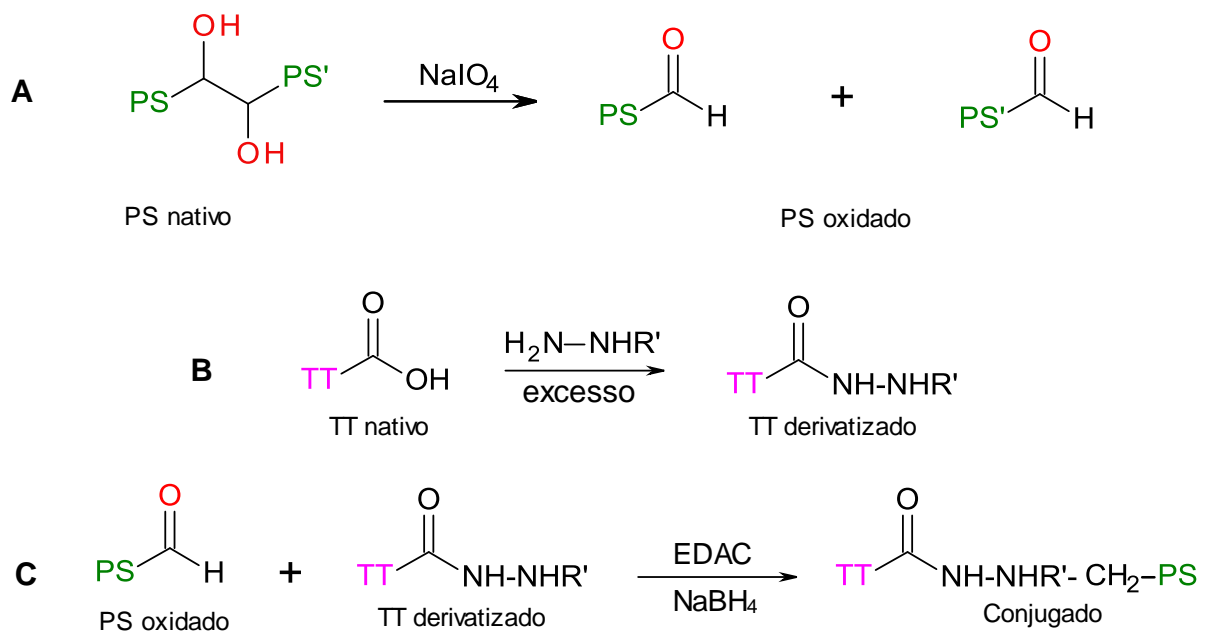
No entanto, novos métodos de conjugação química vêm sendo publicados, estimando um rendimento de em torno de 50% através da ativação por inserção de grupamentos reativos tanto no PS como na proteína para o processo de conjugação. Tais métodos consistem na: 1) oxidação do PS para obtenção de grupos aldeídicos que são posteriormente derivatizados com moléculas contendo grupamentos aminoxi que, por fim, reagem com aldeídos gerados na proteína após a introdução de grupos dióis na mesma, formando uma ligação oxima (**Esquema 3**) (LEES; SEM; LOPEZ-ACOSTA, 2006). Tal método possibilitou um rendimento de 44% para a conjugação química entre dextran e albumina bovina sérica (BSA). No entanto, o mesmo apresenta como desvantagem um alto custo dos reagentes empregados; 2) oxidação do PS para obtenção de grupamentos aldeídicos e ativação da proteína com uma hidrazida para a ligação de ambos, gerando uma modificação no método clássico de *Aminação Redutiva* (**Esquema 4**) (LEE et al., 2009; SILVEIRA et al., 2007). Este novo método foi utilizado para conjugação dos PSs de *N. Meningitidis* sorotipos A, C e W135 ao toxóide tetânico. Embora os autores não citem os rendimentos obtidos em valores para nenhum deles, eles afirmam que estes são superiores ao método clássico de *Aminação Redutiva*.



Esquema 3: Esquema do Método de Conjugação Química para Formação de Oximas. (A)

Ativação do PS, onde: i) Oxidação das hidroxilas vicinais do PS com conseqüente formação de grupos aldeídos e ruptura da ligação carbono-carbono e ii) Inserção de grupamentos aminoxi no aldeído gerado no PS. **(B)** Ativação da BSA, onde: i) Bromoacetilação da BSA nativa, ii) Reação da BSA bromoacetilada com tioglicerol para inclusão de um grupamento diol na BSA e iii) Oxidação do grupamento diol da BSA para geração de um aldeído. **(C)** Conjugação química entre BSA-aldeído e o PS-aminoxi levando à formação do conjugado.

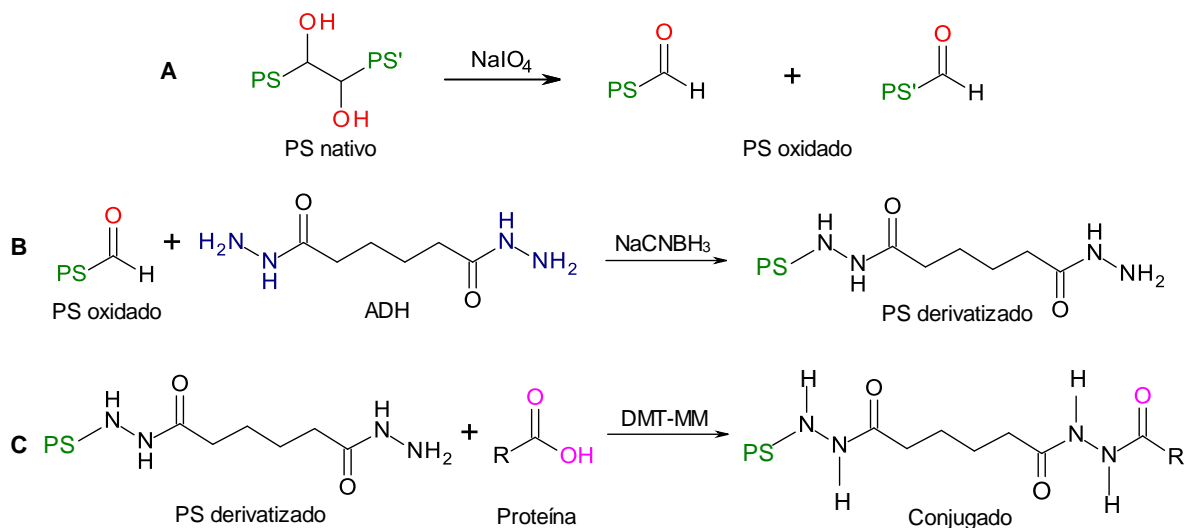
Fonte: Adaptado de Lees, Sen e Lopez-Acosta (2006).



Esquema 4: Esquema da Variante do Método de Conjugação Química via Aminoação Redutiva.

(A) Oxidação das hidroxilas vicinais do PS com conseqüente formação de grupos aldeídos e ruptura da ligação carbono-carbono. (B) Derivatização do toxóide tetânico com hidrazida em excesso e (C) Conjugação química entre o PS-oxidado e o TT-hidrazida na presença do ativador EDAC, levando à formação do conjugado. Fonte: Adaptado de Lee et al. (2009).

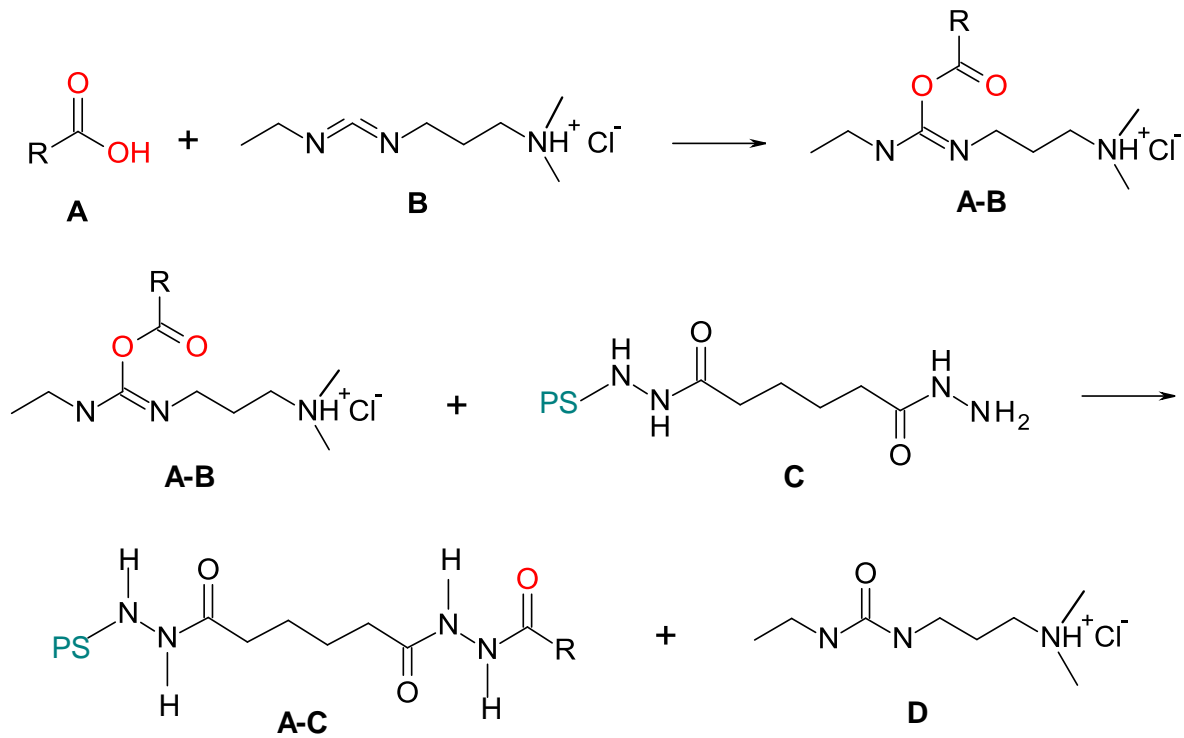
O método de conjugação química apresentado neste trabalho foi o método desenvolvido e otimizado em nosso laboratório para a obtenção do conjugado PS de *H. influenzae* tipo b com o toxóide tetânico, que consiste na oxidação das hidroxilas vicinais do PS para a obtenção de grupos aldeídicos, que são posteriormente reagidos com dihidrazidas (ADH). Por fim, o PS ativado (PS-hidrazida) reage com a proteína ativada em seu grupamento carboxila pelo ativador 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM) (**Esquema 5**) (BARAZZONE; TANIZAKI, 2009; INSTITUTO BUTANTAN, 2009).



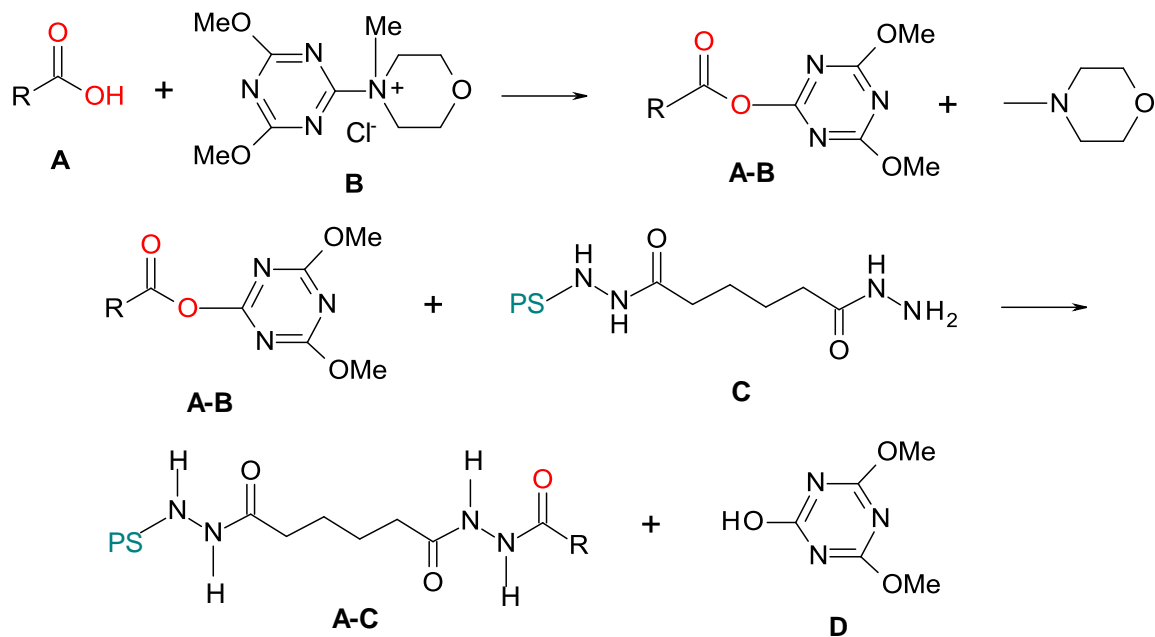
Esquema 5: Esquema do Método de Conjugação Química Utilizado neste trabalho. (A) Oxidação das hidroxilas vicinais do PS com conseqüente formação de grupos aldeídos e ruptura da ligação carbono-carbono. **(B)** Derivatização do PS oxidado com hidrazida em excesso e **(C)** Conjugação química entre o PS-hidrazida e o grupo carboxila da proteína na presença do ativador DMT-MM, levando à formação do conjugado.

Portanto, o método desenvolvido neste trabalho resultou da fusão dos dois métodos clássicos citados acima (**Esquemas 1 e 2**), onde os passos desfavoráveis de ambos como a reação direta de grupamentos aldeídicos gerados no PS com grupamentos ϵ -amino da lisina protéica por *Aminação Redutiva*, que consiste numa reação lenta e de baixo rendimento, assim como a utilização do CNBr (reagente tóxico e instável) puderam ser eliminados.

Além disso, neste trabalho também foi utilizado outro agente ativador, o DMT-MM, que é usualmente empregado na formação de carboxamidas em reações com moléculas orgânicas pequenas (KUNISHIMA et al., 2001), nunca anteriormente descrito para obtenção de antígenos vacinais conjugados. A utilização deste ativador mostrou-se mais efetiva em relação à utilização do EDAC, ativador usualmente empregado e descrito na literatura para tal fim, que possui como principal desvantagem uma alta suscetibilidade à hidrólise, sendo este inativado antes que se possa ocorrer a ativação do grupamento carboxila da proteína para promoção da reação de conjugação, apresentando rendimentos inferiores em relação ao DMT-MM. O **Esquema 6** mostra a ativação do grupo carboxila de proteínas por EDAC e o **Esquema 7** mostra a ativação por DMT-MM.



Esquema 6: Esquema Geral da Reação de Conjugação promovida pela ativação do grupamento carboxila de proteínas por EDAC. (A) Grupamento carboxila de proteínas **(B)** EDAC **(A-B)** Intermediário O-aciluréia reativo gerado pelo ataque nucleofílico do nitrogênio do EDAC à carboxila protéica e **(C)** subsequente reação deste intermediário A-B com o grupamento hidrazida do PS derivatizado com posterior obtenção do conjugado **(A-C)** e liberação do subproduto do EDAC **(D)**.



Esquema 7: Esquema Geral da Reação de Conjugação promovida pela ativação do grupamento carboxila de proteínas por DMT-MM. (A) Grupamento carboxila de proteínas **(B)** DMT-MM **(A-B)** Intermediário reativo gerado pelo ataque nucleofílico do nitrogênio do DMT-MM à carboxila protéica e **(C)** subsequente reação deste intermediário A-B com o grupamento hidrazida do PS derivatizado com posterior obtenção do conjugado **(A-C)** e liberação do subproduto do DMT-MM **(D)**.

1.2 Epidemiologia

1.2.1 Perfil Epidemiológico da Doença Pneumocócica

S. pneumoniae é uma das principais causas de pneumonia e meningite bacterianas, assim como de septicemia em crianças, estando estas infecções entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo. No entanto, muitos países carecem de estimativas nacionais de incidência da doença pneumocócica (O'BRIEN et al., 2009; WHO, 2007).

Mundialmente, *S. pneumoniae* é responsável por cerca de 14,5 milhões de episódios de doença grave (**Figura 2**) e 826.000 mortes anuais em crianças de 1 a 59 meses, das quais 91.000 ocorrem em HIV positivas e 735.000 em HIV negativas (**Figura 3**). Das mortes em crianças HIV negativas, mais de 61% ocorrem em países da África e da Ásia (O'BRIEN et al., 2009; WHO, 2009a).

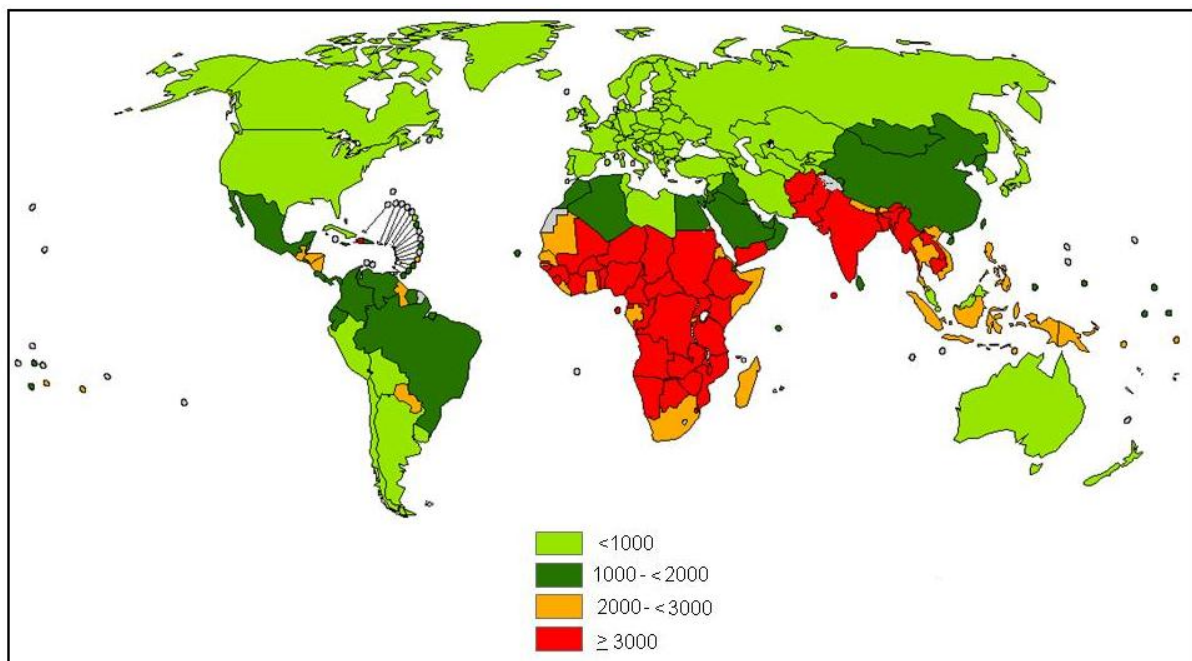


Figura 2: Taxa da incidência de doenças pneumocócicas para cada 100.000 crianças abaixo de 5 anos de idade. Estimativa de 14,5 milhões de casos a nível mundial.

Fonte: WHO (2009a).

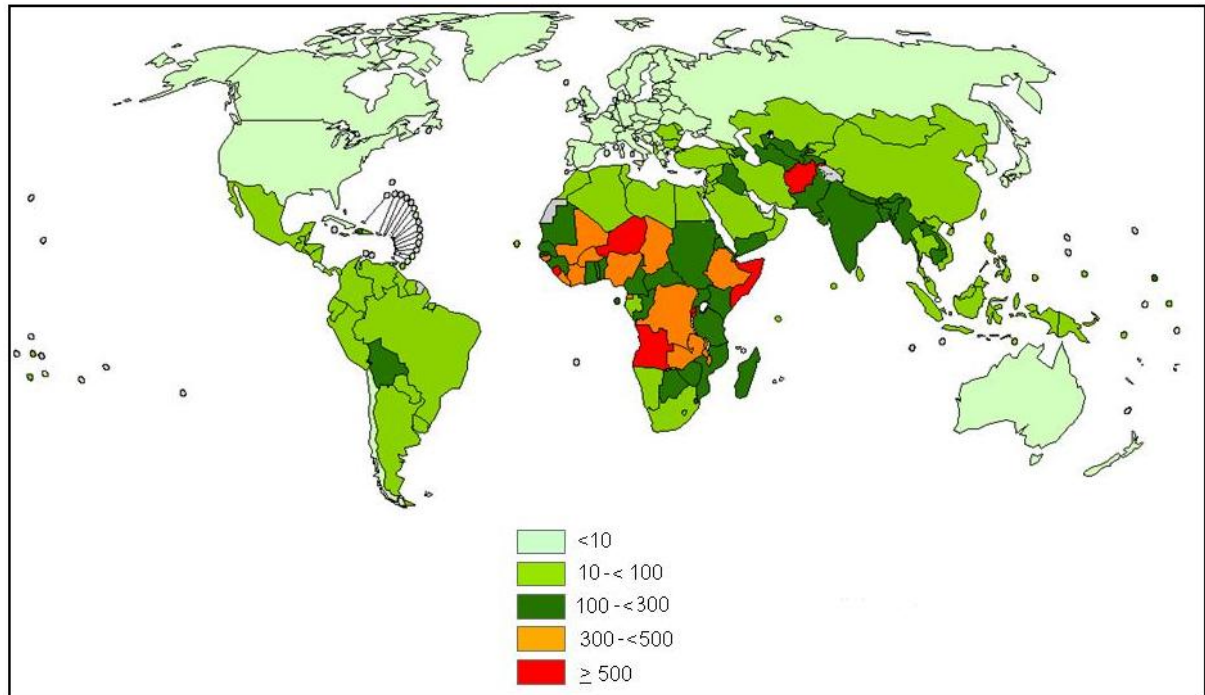


Figura 3: Taxa de mortalidade por doenças pneumocócicas para cada 100.000 crianças abaixo de 5 anos de idade. Estimativa de 735.000 mortes a nível mundial. O número de mortes em pacientes HIV⁺ não está incluído.
Fonte: WHO (2009a).

Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que em países da América Latina e do Caribe, ocorrem 1,6 milhões de episódios de doença pneumocócica, das quais aproximadamente 800.000 são em crianças menores de 5 anos de idade. Estima-se que dentre as infecções graves, 400.000 levam à hospitalização, deficiência permanente e/ou morte. Portanto, estima-se um total de 16.980 mortes anuais em crianças abaixo de 5 anos de idade apenas por pneumonia pneumocócica na América Latina (**Figura 4**). (CONSTENLA, 2008; QUADROS, 2009).

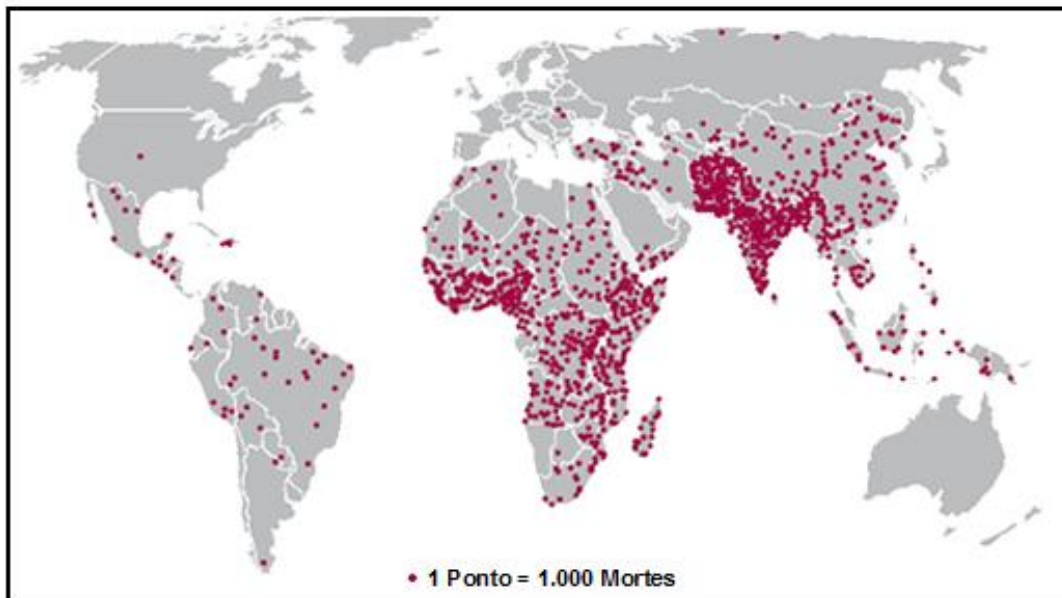


Figura 4: Representação do número de mortes por pneumonia em crianças abaixo de 5 anos de idade.

Fonte: Ramakrishnan e Foreman (2008b).

A pneumonia é a principal causa de morte de crianças menores de 5 anos de idade, onde *S. pneumoniae* é a causa mais comum de pneumonia, enquanto *H. influenzae* tipo b e *Moraxella catarrhalis* são associados com exacerbações da doença pulmonar obstrutiva crônica (MACKENZIE et al., 2010). No entanto, as infecções respiratórias causadas por *S. pneumoniae* são uma importante causa de morbidade e mortalidade entre adolescentes (CDC, 2008).

Em 2005 e 2006, as taxas de incidência e de internações por pneumonia em crianças de 2 anos de idade foram de 9,1/1000 e 8,1/1000, respectivamente. Em 2006, a taxa para todas as causas de pneumonia em crianças de 2 anos de idade foi aproximadamente 35% menor do que durante o período 1997-1999, onde a maior parte desta diminuição ocorreu logo após a introdução da vacina conjugada 7-valente em 2000. As taxas mantiveram-se relativamente estáveis desde então (CDC, 2009).

Desta forma, a OMS acredita que a vacinação torna-se prioritária em países em desenvolvimento (WHO, 2007).

Em relação à meningite meningocócica são estimados anualmente 3.637 casos de meningite na América Latina. Apesar da antibioticoterapia, a meningite meningocócica apresenta uma taxa de mortalidade de até 60% na América Latina (QUADROS, 2009).

Desde 1999, com a introdução da vacina conjugada contra *H. influenzae* tipo b no programa de imunização brasileiro, o pneumococo se tornou a principal causa de meningite em crianças menores de 5 anos de idade, com uma taxa anual de incidência de 10 casos/100.000 crianças até 1 ano de idade e uma taxa de letalidade global de 27,5% (BRANDILEONE et al., 2003; QUADROS, 2009).

Cefalosporinas de terceira geração ainda permanecem como opção de tratamento para meningite em países da América Latina, já que apenas 14,3% dos isolados são resistentes (CASTAÑEDA et al., 2009).

O pneumococo é o patógeno mais comumente encontrado em fluidos no ouvido médio. A otite média causada pelo pneumococo persiste em 89% dos casos sem cura espontânea, enquanto a causada por *H. influenzae* tipo b cura-se espontaneamente em 52% dos casos. O pneumococo também gera mais complicações, como perfuração da membrana timpânica, meningite, abscesso cerebral, mastoidite e perda da audição (QUADROS, 2009).

Para cada mil crianças nascidas no Brasil, Chile e Uruguai, a doença pneumocócica resulta em 324 casos de otite média, 79 casos de pneumonia, 48 casos de meningite e menos de um apresenta sepse, estimando-se 21 mortes para cada mil crianças por doenças pneumocócicas (CONSTENLA, 2008).

Globalmente, cerca de 20 sorotipos estão associados com mais de 80% da DPI em todas as faixas etárias, onde os 13 sorotipos mais comuns causam pelo menos 70-75% das doenças invasivas em crianças (WHO, 2007).

A incidência da DPI é maior em crianças menores de 2 anos e em idosos (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004; DAGAN et al., 1998).

Nos EUA, até o ano 2000, as infecções causadas por *S. pneumoniae* resultaram em 100,000-135,000 internações por pneumonia, 6 milhões de casos de otite média e 60.000 casos de DPI, incluindo 3.300 casos de meningite por ano. Dos 60.000 casos de DPI, até 40% destes foram causados por pneumococos não-suscetíveis a pelo menos um medicamento. No entanto, no de 2002 estes números foram alterados devido à introdução da vacina conjugada 7-valente para crianças neste país (CDC, 2008; CDC, 2010).

A **Figura 5** mostra a redução dos casos de DPI e a sua estabilidade até o ano de 2007 de acordo com a faixa etária (CDC, 1997; CDC, 2002; CDC, 2007).

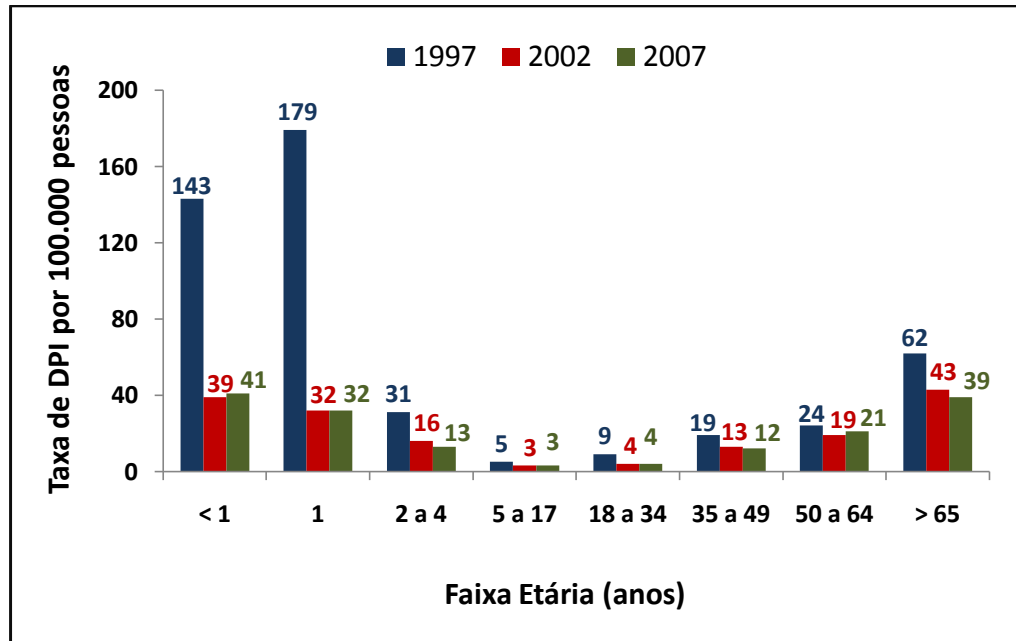


Figura 5: Taxa de DPI de acordo com a faixa etária antes e após a introdução da vacina conjugada 7-valente nos EUA.

Fonte: CDC 1997, 2002 e 2007 - ABCs Report Emerging Infections Program Network, *Streptococcus pneumoniae*.

Além disso, a incidência entre crianças e adultos jovens também vem diminuindo devido à melhoras no tratamento do HIV (CDC, 2010).

Nos EUA, um ano após a introdução da vacina conjugada 7-valente no programa nacional de imunização, a incidência de DPI causada pelos sorotipos pneumocócicos presentes na vacina foi reduzida em 100% entre crianças vacinadas com idade abaixo de 1 ano (WHO, 2007).

Em adultos de 20-39 anos, a redução da DPI foi de 52% e, em indivíduos com idade acima de 60 anos, essa redução foi de 27%. O declínio na incidência entre jovens acima de 5 anos de idade que não receberam a vacina é provavelmente devido ao fato da transmissão ter sido reduzida por crianças vacinadas, um fenômeno conhecido como imunidade indireta. Nos EUA, cerca de 68% na redução de todos os casos de DPI foram atribuídos pelo efeito indireto (WHO, 2007).

Não obstante, no ano de 2008 foi observada uma mudança na definição da não suscetibilidade à penicilina, onde ocorreram 41.500 casos de DPI. Destes, 28% foram causados por pneumococos não suscetíveis a pelo menos um antibiótico e 11% se deveram à linhagens não suscetíveis a 3 ou mais drogas. Esses dados reforçam a necessidade de uma prevenção mais adequada da doença, onde campanhas para o uso mais criterioso de antibióticos, além do uso da vacina

conjugada em crianças menores de 5 anos de idade, assim como o uso ampliado da vacina polissacarídica 23-valente em adultos e crianças de alto risco podem retardar ou reverter a emergente resistência à antibióticos, já que após a introdução da vacina conjugada 7-valente houve uma redução nos casos de infecções por pneumococos resistentes, sendo esperado que a nova vacina conjugada 13-valente irá prevenir infecções causadas por cepas resistentes (CDC, 2010).

1.2.2 Programas de Vigilância e Distribuição dos Sorotipos Pneumocócicos

A distribuição dos sorotipos pneumocócicos pode variar de acordo com a região geográfica, o tempo, a apresentação clínica e a idade dos pacientes. A ordem de classificação dos sorotipos, entre invasivos e não invasivos, também varia de acordo com a região geográfica e a população. Desta forma, avaliações periódicas tornam-se necessárias para o estabelecimento de estratégias de controle (BEREZIN et al., 2007; BRANDILEONE et al., 2003; DAGAN; LIPSITCH, 2004).

Apesar das estimativas globais serem importantes para as instituições internacionais e iniciativas globais, elas têm uso limitado para os decisores políticos nacionais mesmo que estudos nacionais e internacionais mostrem similaridades no espectro de prevalência dos sorotipos. Sendo assim, para se estabelecer a relevância epidemiológica de uma formulação de vacina conjugada, torna-se fundamental compreender a epidemiologia local da DPI em determinados contextos geográficos, especialmente nos países em desenvolvimento, onde o impacto da DPI em crianças é o mais elevado (DI FABIO et al., 2001; MANTESE et al., 2009; O'BRIEN et al., 2009). O monitoramento da DPI em crianças também se torna importante na avaliação do impacto de novas vacinas, assim como os seus efeitos indiretos em adultos (QUADROS, 2009; WHO, 2009b).

Estudos de vigilância têm contribuído para uma melhor compreensão da epidemiologia da doença pneumocócica no mundo, onde o sistema regional de vacinas (SIREVA), se destacou como um dos programas mais bem sucedidos a fim de monitorar o padrão de resistência à antibióticos e o perfil dos sorotipos pneumocócicos ao longo do tempo na América Latina. O SIREVA foi criado em 1993 pela organização Pan Americana de Saúde (OPAS) com ajuda de fundos da agência de desenvolvimento Canadense, sendo o primeiro programa internacional de vigilância prospectiva nos países em desenvolvimento, monitorando a DPI em

crianças menores de 6 anos de idade a partir de amostras isoladas em laboratórios de referência participantes. O SIREVA conta com a participação de seis países: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México e Uruguai (CASTAÑEDA et al., 2009; FICARATIVE et al., 2009; WOLKERS et al., 2009; WHO, 2009b).

No entanto, a partir de 1994 este programa foi estendido a fim de incluir outros agentes, como o *H. influenzae* e *N. meningitidis* assim como outros países, onde atualmente 20 países fazem parte deste projeto, chamado SIREVA II. O SIREVA II inclui os países: Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Equador, El Salvador, Honduras, Guatemala, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, República Dominicana, Trindade e Tobago, Uruguai e Venezuela (WOLKERS et al., 2009).

No período de 1993-1998, os 15 sorotipos prevalentes em crianças até os 6 anos de idade no Brasil em 1.069 isolados foram: 14 (24,7%); 1 (10,3%); 6B (10,0%); 18C (7,9%); 5 (6,5%); 6A (5,4%); 23F (5,2%); 19F (4,5%); 9V (4,2%); 19A (3,2%); 3 (2,3%); 4 (1,6%); 10A (1,6%); 8 (1,4%); 7F (0,7%). Outros sorotipos correspondiam à apenas 10,5% dos casos (BRANDILEONE, 1999).

No período de 1977-2000, os 13 sorotipos prevalentes em todas as faixas etárias no Brasil em 4.858 isolados foram: 14 (15.6%); 1 (9.4%); 6B (7.3%); 5 (6.1%); 18C (6.0%); 6A (5.0%); 3 (4.9%); 23F (4.7%); 19F (4.4%); 9V (3.2%); 4 (2.9%); 19A (2.5%) e 10A (2.4%), onde para crianças até 5 anos de idade, as quais são consideradas o principal grupo de risco, os isolados prevalentes foram: 14 (28.5%); 6B (10.2%); 1/19F (9.5%); 5/23F (7.3%); 18C/19A (4.4%); 3/6A (2.2%); 9V/7F (1.5%); 4 (0.7%) (BRANDILEONE et al., 2003).

No período 2000-2005, os 4 isolados mais identificados em crianças brasileiras com até 6 anos de idade foram: 14 (35,9%), 6B (11%), 18C (6,1 %) e 1 (5,6%) (CHIOU et al., 2008).

Já em uma coleta de 6.548 cepas invasivas em diferentes regiões do Brasil durante um período de 8 anos (de 2000-2005, em 2006 e em 2007), 5.742 cepas foram sorotipadas, sendo as mais freqüentes pertencentes aos sorotipos 14, 6B, 18C, 19F, 23F, 1, 6A, 5, 19A, 9V, 3, 7F e 4 (MANTESE et al., 2009).

Os sorotipos 14, 1, 5, e 6B representam 64,7% dos isolados causadores de pneumonia, enquanto os sorotipos 14, 6B, 18C, 19F, 23F e 5 representam 64,3% dos isolados causadores de meningite e os sorotipos 14, 6B, 18C, 19F, 1, 6A e 19A representam 64,5% dos isolados causadores de DPI. Sendo assim, o sorotipo 14 é a

principal causa em todas as categorias de doença pneumocócica (CASTAÑEDA et al., 2009).

Apesar do sorotipo 14 ser a principal causa de meningite e pneumonia em crianças, tendo a sua importância já bem reconhecida em infecções durante a infância no Brasil e em diversos países, ele é menos comum entre adultos e idosos. Em contraste, os sorotipos 1, 3, 4 e 6B são prevalentes em todas as idades (BRANDILEONE et al., 2003; DAGAN; LIPSITCH, 2004; MANTESE et al., 2009).

O sorotipo 14 foi o principal isolado resistente à penicilina em diversos estudos, mostrando-se também altamente resistente à ampicilina (BRANDILEONE et al., 2003), além de ser o sorotipo mais associado a resistência à eritromicina, inclusive no Brasil (FRANCO et al., 2010). Dentre os sorotipos pediátricos – 6A/6B, 14, 19F e 23F – que são responsáveis por um grande número de episódios de infecção em crianças, o sorotipo 14 tornou-se o mais importante a nível mundial (CASTAÑEDA et al., 2009).

O sorotipo 6B se encontra como o segundo sorotipo mais prevalente no Brasil (BRANDILEONE et al., 2003; MANTESE et al., 2009).

No Brasil, o sorotipo 1 é uma das causas mais prevalentes de infecção grave, onde estudos estabeleceram claramente uma mudança temporal entre duas linhagens de *S. pneumoniae* sorotipo 1 no Brasil, com uma grande dispersão do clone Sweden¹-40 nos últimos anos (CHIOU et al., 2008).

Os sorotipos 1 e 5 estão entre os sorotipos mais comuns causadores de DPI no Brasil. Postula-se que, devido à sua virulência, os sorotipos 1 e 5 têm uma passagem transitória e rápida pela nasofaringe antes de chegarem à corrente sanguínea. Vacinas eficazes, que incluam os sorotipos 1 e 5 seriam capazes de evitar mais de 90% dos casos de DPI (BEREZIN et al., 2007).

O sorotipo 19A, como citado anteriormente (**seção 1.1.5**), representa o principal sorotipo emergente nos EUA mostrando, também, grande importância no Brasil após a introdução da vacina conjugada 7-valente (FRANCO et al., 2010; MANTESE et al., 2009).

Em conclusão, os programas atuais de vigilância destinados a estabelecer as relações genéticas entre isolados invasivos de sorotipos de *S. pneumoniae* que não estão inclusos na vacina conjugada 7-valente podem contribuir para a avaliação da pressão seletiva que pode ser gerada quando as vacinas conjugadas 10- e 13-

valente estiverem sendo amplamente utilizadas, permitindo a detecção de alterações genéticas de isolados ou o surgimento de novos clones.

No entanto, a prevenção da doença pneumocócica e de mortes só se torna viável se esforços para fornecer e implementar programas de prevenção nas regiões com a maior incidência da doença forem bem sucedidos. Em agosto de 2008, 24 países de alta renda e 2 países de média renda haviam iniciado a vacinação pneumocócica de rotina com a vacina conjugada 7-valente, mas nenhum país na África ou na Ásia, que apresentam os maiores números de casos e mortes por DPI (O'BRIEN et al., 2009).

A **Figura 6** mostra o perfil global de introdução da vacina conjugada.

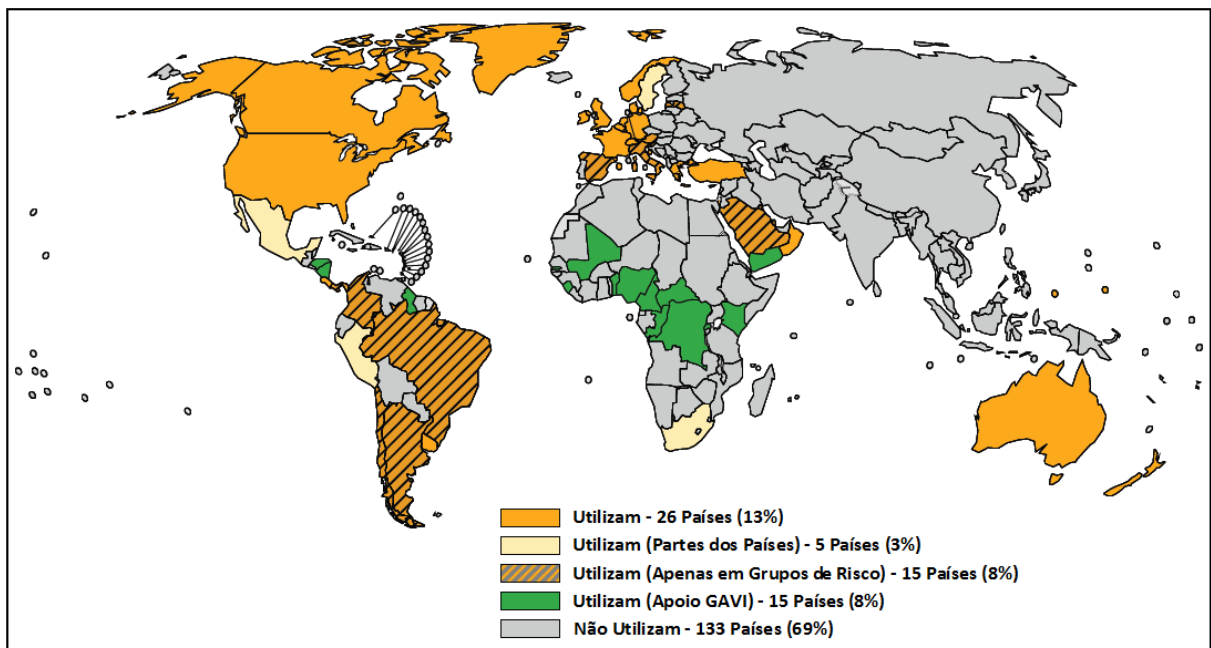


Figura 6: Perfil Global de Introdução da Vacina 7-valente Conjugada.

Fonte: WHO (2009c).

Estes 26 países representam menos de 0,2% dos óbitos infantis globais em 2000 (O'BRIEN et al., 2009).

Através da Aliança GAVI "*The Global Alliance for Vaccines and Immunization*", os países de baixa renda podem acessar existentes e futuras vacinas contra o pneumococo, através de uma pequena contribuição auto-financiada (US\$0,15 a US\$0,30 por dose) para os próximos seis anos. Em fevereiro de 2009, 11 países foram aprovados pela Aliança GAVI para receberem suporte para introdução da vacina, sendo oito na África e Ásia. Outros 30 países elegíveis pela

Aliança GAVI manifestaram interesse em receber suporte para introdução da vacina (O'BRIEN et al., 2009).

A **Figura 7** mostra alguns dos países elegidos pela GAVI e a data de introdução da vacina conjugada para os mesmos.

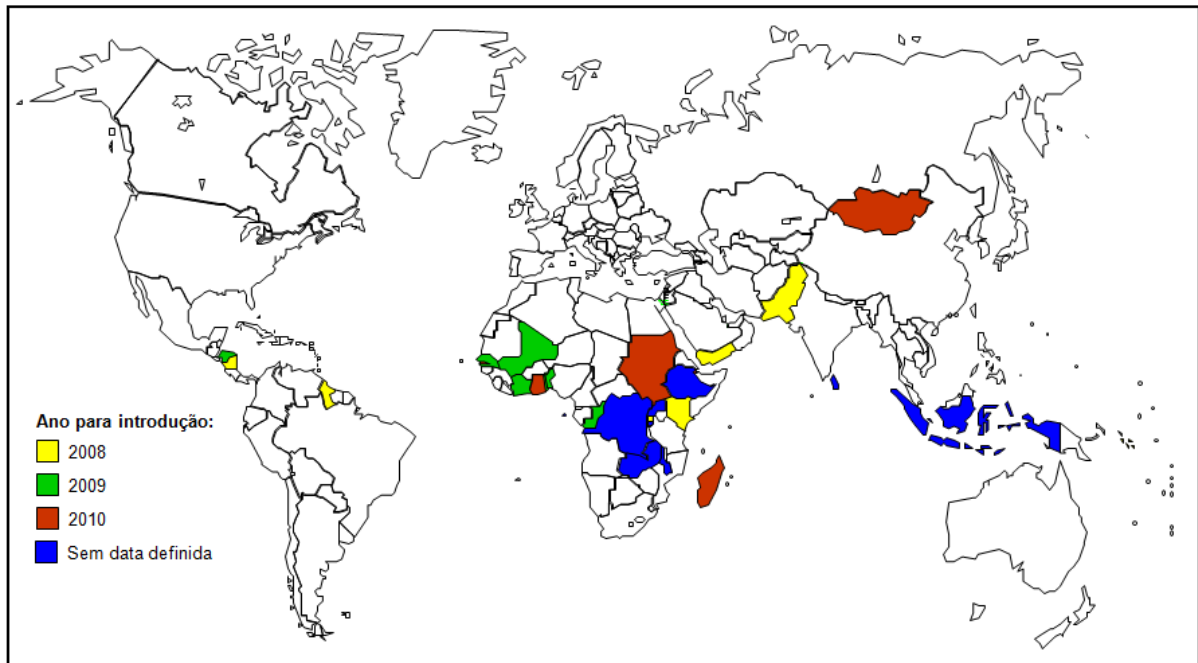


Figura 7: Países Elegidos pela Aliança GAVI e Ano de Introdução da Vacina 7-valente Conjugada.

Fonte: Ramakrishnan e Foreman (2008b).

1.2.3 Perfil da Resistência Pneumocócica

O padrão de resistência à antibióticos apresenta grande importância para se estabelecer a taxa de resistência pneumocócica determinando, assim, o melhor tratamento empírico a ser iniciado (WOLKERS et al., 2009).

Neste contexto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) têm desenvolvido, então, como estratégia para redução de infecções respiratórias agudas entre as crianças, o tratamento padrão baseado em antibioticoterapia empírica adequada. Portanto, os esforços a fim de se reduzir a mortalidade por infecções pneumocócicas são baseados principalmente no rápido diagnóstico e em antibioticoterapia adequada. Esta abordagem, quando idealmente aplicada, tem sido eficaz na redução da mortalidade infantil por pneumonia em 50%, reduzindo a mortalidade infantil geral em 25% (CARDOSO et al., 2008; ROSSONI et al., 2008).

Não obstante, o acompanhamento periódico torna-se complicado devido a dificuldades na identificação do pneumococo por métodos laboratoriais. Desta forma, o patógeno não é diagnosticado como *S. pneumoniae* na maioria dos casos (QUADROS, 2009).

Como resultado, as últimas 4 décadas foram marcadas pelo surgimento de cepas resistentes à maioria dos antibióticos comumente utilizados, tornando a doença pneumocócica um problema de saúde pública mundial devido à maior dificuldade no estabelecimento de uma terapêutica antibiótica empírica (HORTAL et al., 2001; ROSSONI et al., 2008).

Em 1967, surgiu o primeiro isolado clínico de pneumococo resistente à penicilina na Austrália e, em seguida, na África do Sul, onde essas observações foram consideradas um fenômeno incomum (HANSMAN et al., 1967; HORTAL et al., 2001).

A partir de 1980, casos de resistência surgiram em várias regiões geográficas do mundo (HORTAL et al., 2001; ROSSONI et al., 2008; RUBIN et al., 2000).

Durante a década de 1990, houve uma dramática redução nas taxas de suscetibilidade à penicilina em muitos países, com taxas de prevalência, por vezes, superior à 40%. Este aumento na resistência à penicilina foi seguido pelo aparecimento de resistência às cefalosporinas de terceira geração, o que criou sérios desafios para a gestão da meningite pneumocócica (BRANDILEONE et al., 2006; HANSMAN et al., 1967; HORTAL et al., 2001; JACOBS et al., 2008; ROSSONI et al., 2008; RUBIN et al., 2000).

As cepas atualmente resistentes são sempre associadas à resistência a outros antibióticos, onde as cepas resistentes à penicilina, também se mostram resistentes à outros antibióticos, tais como a eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina e cloranfenicol. As infecções causadas por estas cepas multirresistentes apresentam um desafio significativo para o paciente (HORTAL et al., 2001; ROSSONI et al., 2008).

Conseqüentemente, como citado anteriormente (**seção 1.2.2**), muitos países têm implementado programas de vigilância nacional para monitorar a resistência de pneumococos aos antibióticos, onde as agências internacionais de saúde pública têm recomendado essa coleta de dados para a escolha racional de tratamentos empíricos (BRANDILEONE et al., 2006; HANSMAN et al., 1967; HORTAL et al., 2001; ROSSONI et al., 2008; RUBIN et al., 2000).

Sendo assim, no ano de 1997 foi criada a Rede de Epidemiologia Molecular do Pneumococo ou “*Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*” (PMEN) para acompanhar a resistência antimicrobiana do pneumococo mundialmente, assim como padronizar a nomenclatura e classificação dos clones resistentes.

Existem atualmente 43 clones descritos pela PMEN, sendo eles: Colombia⁵-19, Colombia^{23F}-26, Czech Republic¹⁴-10, Czech Republic^{19A}-11, England¹⁴-9, Finland^{6B}-12, Greece^{6B}-22, Hungary^{19A}-6, Maryland^{6B}-17, N.Carolina^{6A}-23, Poland^{6B}-20, Poland^{23F}-16, Portugal^{19F}-21, South Africa^{6B}-8, South Africa^{19A}-7, South Africa^{19A}-13, Spain^{6B}-2, Spain^{9v}-3, Spain¹⁴-5, Spain^{23F}-1, Sweden^{15A}-25, Taiwan^{19F}-14, Taiwan^{23F}-15, Tennessee¹⁴-18, Tennessee^{23F}-4, Utah^{35B}-24. Os 17 clones restantes ainda não foram completamente identificados e depositados com a ATCC – *The American Type Culture Collection* (PMEN, 2010).

Destes 26 clones, 7 encontram-se na América Latina: Colombia⁵-19, Colombia^{23F}-26, Czech Republic¹⁴-10, England¹⁴-9, Spain^{6B}-2, Spain^{9v}-3 e Spain^{23F}-1, onde os clones Spain^{23F}-1 (sorotipo 23F) e France^{9v}-3 (sorotipo 9/14) são os mais amplamente divulgados, além de se mostrarem resistentes a diversas classes de antibióticos (HORTAL et al., 2001; ROSSONI et al., 2008).

No Brasil, foi identificada a circulação de 6 clones, sendo eles: Colombia^{23F}-26, Spain^{6B}-2, Spain^{9v}-3, Spain^{23F}-1, Sweden¹-40 e Tennessee¹⁴-18 (CHIOU et al., 2008; PMEN, 2010).

Desta forma, o aumento na resistência pneumocócica no Brasil está associado à disseminação de seis clones internacionais, sendo os clones Spain^{9v}-3 e Tennessee¹⁴-18 predominantes nas regiões Sul e Sudeste do país após 1998. Ambos os clones expressam cápsula do sorotipo 14 e são caracterizadas pela resistência microbiana à antibióticos (MANTESE et al., 2009; NICOLETTI et al., 2007).

Na América Latina, o primeiro caso de resistência foi relatado em 1981 no México, enquanto no Brasil o primeiro caso foi relatado em 1988 em São Paulo (CAMARGOS et al., 2006).

No Brasil, de acordo com dados do SIREVA, a taxa de resistência intermediária de isolados causadores de DPI resistentes à penicilina em crianças menores de 6 anos de idade variou de 24,6% em 2000 a 25,4% em 2005, enquanto altos níveis de resistência variaram de 5.7% a 16.5% no mesmo período. Já os relatos de multirresistência variam nas taxas entre os antibióticos (2,6% cefotaxima,

65% sulfametoxazol; 14,6% tetraciclina; 6,2% eritromicina, 1,3% cloranfenicol e 0,7% rifampicina). Não há relatos de cepas resistentes à vancomicina até o momento (ROSSONI et al., 2008).

O uso excessivo de eritromicina e outros macrolídeos em infecções respiratórias em crianças é preocupante e a adesão ao uso racional de antibióticos para evitar aumentos na resistência deve ser reforçada (HORTAL et al., 2001).

As causas que contribuem para o surgimento de resistência antimicrobiana em *S. pneumoniae* são multifatoriais.

A resistência pneumocócica está relacionada à pressão seletiva que o pneumococo vem sofrendo pelo uso disseminado e prolongado da penicilina. Não obstante, os antibióticos β -lactâmicos ainda são os fármacos de referência para o tratamento de infecções pneumocócicas. A resistência a estes antibióticos está associada a alterações nas proteínas de ligação à penicilina na parede celular bacteriana, denominadas *PBP - penicilin binding proteins*, reduzindo a afinidade dos antibióticos às mesmas (BRANDILEONE et al., 2006; ROSSONI et al., 2008).

Pelo fato do *S. pneumoniae* ser um organismo naturalmente transformável, a pressão seletiva de qualquer antibiótico pode facilitar a incorporação de DNA extracromossômico de fragmentos derivados de outras espécies de estreptococos, codificando mecanismos de resistência a vários antibióticos. Tal processo é denominado resistência múltipla ou multirresistência, quando presente em três ou mais grupos de antibióticos. Este processo também pode ocorrer por sucessivas mutações no código genético (HORTAL et al., 2001; ROSSONI et al., 2008).

Portanto, deve-se ressaltar que alguns estudos têm detectado uma diminuição significativa nas taxas de pneumococos resistentes na Europa e nos EUA após a introdução da vacina conjugada 7-valente, juntamente com uma redução nos níveis de consumo de antibióticos reforçando, novamente, a importância da vacinação (BRANDILEONE et al., 2006).

1.3 Fatores de Virulência

1.3.1 Cápsula Polissacarídica

A cápsula polissacarídica é constituída de unidades repetidas de uma estrutura básica de três ou mais monômeros de açúcares, podendo conter também grupos fosfato e glicerol. De acordo com a estrutura química do polissacarídeo capsular, as bactérias encapsuladas são divididas em sorotipos onde, atualmente, pelo menos 92 diferentes sorotipos de pneumococo são descritos, dos quais 23 destes sorotipos são comumente encontrados na população (HENRICHSEN, 1995; MALLEY, 2010).

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência do pneumococo. Diferenças na virulência dos diversos sorotipos têm sido relacionadas à habilidade de cada polissacarídeo capsular específico bloquear o acesso de anticorpos sorotipo-específicos e complemento à componentes de superfície ou de mascarar o fragmento C3b ligado pelo reconhecimento de receptores fagocíticos (YOTHER, 2004; MARTNER et al., 2009).

O impacto médico das infecções causadas por bactérias encapsuladas, em particular por pneumococo, foi evidente no início do século XX, que marcou a história do desenvolvimento de vacinas anti-pneumocócicas e, a partir de então, as propriedades imunológicas dos polissacarídeos capsulares se tornaram alvo de estudo nos anos 20 e 30 (ECHÁNIZ-AVILÉS; SOLÓRZANO-SANTOS, 2001; LINDBERG, 1999).

1.3.1.1 *Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14*

Mundialmente, o sorotipo 14 é um dos mais freqüentes isolados clínicos de pneumococo. Com predominância entre as crianças, soma 50% dos isolados resistentes à penicilina (ANDRADE et al., 2010; CASTAÑEDA et al., 2009).

No Brasil, é o sorotipo mais associado à resistência à penicilina, assim como a outros antibióticos comumente utilizados (BRICKS; BEREZIN, 2006).

No Brasil, após 1998, estudos têm mostrado a sua rápida disseminação através dos clones internacionais Spain^{9V}-3 e Tennessee¹⁴-18, caracterizados pela

resistência à antibióticos (ANDRADE et al., 2010; MANTESE et al., 2009; NICOLETTI et al., 2007).

Estudos recentes mostram que o polissacarídeo capsular sorotipo 14 (PS14) é expresso em 48,5% dos isolados de crianças abaixo de 24 meses e em 36,5% dos isolados de crianças entre 25-60 meses, onde no período de 1999-2003 foi encontrado em 42,2% dos isolados e no período de 2004-2008 em 51,5% dos isolados (MANTESE et al., 2009).

Neste mesmo estudo, o diagnóstico clínico relatou que 50% dos casos de pneumonia eram causados pelo sorotipo 14, enquanto dentre os casos de meningite, 45,5% eram recorrentes do sorotipo 14 (MANTESE et al., 2009).

Portanto, devido a sua importância a nível mundial, o PS14 está incluso em todas as vacinas anti-pneumocócicas (COLINO; SNAPPER, 2007).

O PS14 é um heteropolímero ramificado composto de subunidades repetitivas de um tetrassacarídeo contendo um esqueleto linear de três açúcares: (1→4)-β-D-glicose-(1→6)-β-N-acetil-D-glicosamina-(1→3)-β-D-galactose, com uma ramificação monossacarídica lateral composta por (1→4) β-D-galactose no carbono 4 do resíduo de N-acetil-D-glicosamina (COLINO; SNAPPER, 2007; LINDBERG; LÖNNGREN; POWELL, 1997). A **Figura 8** mostra a estrutura química do PS14.

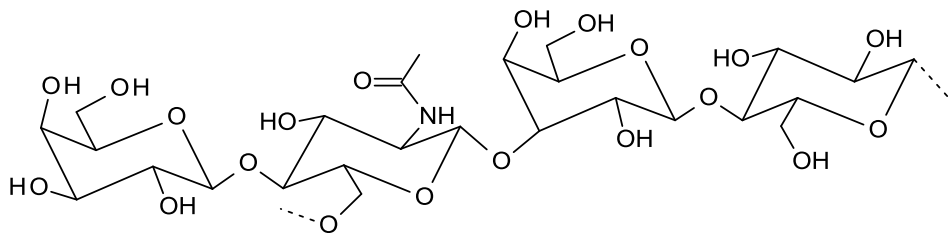


Figura 8: Subunidade de Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14.

Fonte: Klein e Ellis (1997).

1.3.2 Neuraminidase (NanA)

A neuraminidase ou NanA, também conhecida como sialidase, cliva o ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico) de glicolípídeos, lipoproteínas e oligossacarídeos na superfície de células hospedeiras e em fluidos corporais, onde um estudo recente mostrou que a NanA pode remover ácido siálico de proteínas solúveis, tais como lactoferrina e IgA2. Como consequência, ela causa danos diretos ao hospedeiro

além de promover a colonização do pneumococo ao expor receptores das células hospedeiras. Desta forma, a NanA desempenha um papel importante na colonização pneumocócica e na formação de biofilme (KADIOGLU et al., 2008; MITCHELL; MITCHELL, 2010; PETTIGREW et al., 2006).

A perda de ácido siálico, como resultado da atividade da NanA também favorece o transporte do pneumococo do tubo de eustáquio para o ouvido médio, onde pôde ser observado o seu papel no desenvolvimento de otite média aguda em modelos chinchila (MITCHELL; MITCHELL, 2010).

1.3.3 Hialuronidase (Hyl)

É produzida e secretada pela maioria dos isolados clínicos de pneumococo, assim como por outras bactérias Gram-positivas. Está diretamente envolvida na invasão do hospedeiro por degradar o ácido hialurônico no tecido conjuntivo de mamíferos e na matriz extracelular (JEDRZEJAS, 2001; MITCHELL; MITCHELL, 2010).

A degradação do ácido hialurônico auxilia na colonização e propagação de pneumococos. O ácido hialurônico também promove a secreção de citocinas ao se ligar à glicoproteína de membrana CD44 em células hospedeiras, potencializando a inflamação pulmonar durante a pneumonia pneumocócica (JEDRZEJAS, 2001; MITCHELL; MITCHELL, 2010).

Pneumococos que produzem elevadas concentrações de hialuronidase rompem mais facilmente a barreira hemato-encefálica e se disseminam de forma mais eficaz. Sendo assim, a hialuronidase apresenta importância na patogenia da meningite (KOSTYUKOVA et al., 1995).

1.3.4 IgA Protease

A imunoglobulina A (IgA) desempenha um papel importante na proteção de superfícies mucosas, sendo esta a imunoglobulina predominante em secreções.

Nas secreções externas, ocorre principalmente na sua forma polimérica, denominada IgA secretora (IgAs), unida a um componente secretor (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; DELVES et al., 2006).

A IgAs é composta por 2 unidades ligadas a uma cadeia J no componente secretor através da sua região Fc. A função deste componente é proteger a IgAs de enzimas proteolíticas, para que a mesma possa exercer a sua função biológica, particularmente no trato gastro intestinal (TGI), onde são encontradas grandes quantidades de enzimas proteolíticas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; FUKUYAMA et al., 2010; KORNFELD; PLAUT, 1981; POULSEN; REINHOLDT; KILIAN, 1996; SIMELL; KILPI; KÄYHTY, 2006).

O papel da IgAs nas mucosas tem sido caracterizado pela inibição da aderência bacteriana e da inflamação, assim como a neutralização de vírus, toxinas e enzimas. Estas ações locais podem servir para retardar a entrada de microrganismos ou de seus produtos no compartimento interno do hospedeiro, prevenindo a lesão de tecidos e órgãos internos (JANOFF et al., 1999).

No homem, a IgA ocorre em duas subclasses, IgA1 e IgA2. Estas subclasses diferem uma da outra em vários aspectos, incluindo pequenas diferenças na estrutura primária, na composição de carboidratos, nas propriedades antigênicas e na sensibilidade à proteólise por proteases bacterianas (SIMELL; KILPI; KÄYHTY, 2006).

As IgA proteases são endopeptidases extracelulares neutras que variam em suas necessidades de íons metálicos e cujo papel no processo infeccioso é a clivagem específica de IgA1 humana na região da dobradiça (KORNFELD; PLAUT, 1981; POULSEN; REINHOLDT; KILIAN, 1996).

Todas as IgA1 proteases estreptocócicas clivam a mesma ligação Prolina-Treonina nas posições 227 e 228 na região da dobradiça da IgA1 humana, que é o seu único substrato conhecido (POULSEN; REINHOLDT; KILIAN, 1996).

Devido à especificidade para IgA1 humana, nenhum modelo animal se encontra disponível para testar a função biológica das IgA1 proteases. No entanto, várias linhas de evidências indiretas sugerem que a atividade da IgA1 protease permite que as bactérias contornem a barreira mucosa, sendo um importante fator de virulência envolvido na colonização (POULSEN; REINHOLDT; KILIAN, 1996).

Para um número de bactérias que colonizam as superfícies mucosas, a produção de IgA1 protease representa um fator de virulência. Portanto, as três principais causas de meningite bacteriana – *H. Influenzar tipo b*, *N. Meningitidis* e *S. pneumoniae* – secretam IgA1 protease (POULSEN; REINHOLDT; KILIAN, 1996).

Portanto, pelo fato dos anticorpos IgA2 serem resistentes à proteases bacterianas, a produção pronunciada de anticorpos IgA2 nas secreções pode oferecer uma vantagem funcional para a defesa de superfícies mucosas contra as bactérias produtoras de IgA1 protease (SIMELL; KILPI; KÄYHTY, 2006). No entanto, a neuraminidase A pneumocócica mostrou remover ácido siálico de IgA2, facilitando a sua colonização (KADIOGLU et al., 2008).

1.3.5 Pneumolisina (Ply)

A pneumolisina faz parte de um grupo de proteínas conhecidas como citolisinas dependentes de colesterol (CDCs) sintetizadas por bactérias Gram-positivas (JEDRZEJAS, 2001; KADIOGLU et al., 2008).

Está presente em todos os isolados de pneumococo, sendo uma enzima citoplasmática de 53 kDa liberada durante a infecção devido à ação da autolisina e que utiliza o colesterol da membrana como receptor, oligomerizando e inserindo-se na membrana das células alvo. Como resultado, ocorre a formação de poros compostos por aproximadamente 40 subunidades monoméricas. Uma vez formados os poros, a célula é lisada (JEDRZEJAS, 2001; KADIOGLU et al., 2008; PRICE; CAMILLI, 2009; YOO et al., 2010).

A pneumolisina também tem se mostrado necessária para a propagação de pneumococos dos pulmões para a corrente sanguínea (KADIOGLU et al., 2008).

Embora seja uma toxina citoplasmática, têm sido recentemente relatado que ela também está localizada na parede celular (PRICE; CAMILLI, 2009; YOO et al., 2010).

1.3.6 Proteínas de Superfície Pneumocócica

Na superfície da parede celular de *S. pneumoniae* há uma série de proteínas associadas envolvidas na sua patogênese durante a infecção, incluindo a autolisina (LytA), antígeno de superfície pneumocócica A (PsaA), algumas adesinas e as proteínas de superfície pneumocócica A (PspA) e C (PspC) (PRICE; CAMILLI, 2009; YOO et al., 2010).

Pneumococos expressam ChoP como componente dos ácidos teicóicos da parede celular e em ácidos lipoteicóicos presentes na membrana. A ChoP ancora

um grupo de proteínas na parede celular do pneumococo denominadas proteínas de ligação à colina. A maioria dessas proteínas têm seqüências repetidas de aproximadamente 20 aminoácidos que medeiam a sua fixação, onde *S. pneumoniae* codifica 10-15 proteínas de ligação a colina, incluindo LytA, PspC e PspA (KADIOGLU et al., 2008).

A importância das proteínas pneumocócicas na virulência e, mais precisamente, das proteínas de superfície expostas, tem se tornado clara nos últimos 20 anos (FROLET et al., 2010; KADIOGLU et al., 2008).

Portanto, as proteínas de superfície pneumocócica se apresentam como candidatos vacinais promissores pois, em contraste aos polissacarídicos, são comuns à todos os sorotipos de *S. pneumoniae*, onde os dois candidatos mais atraentes são a PspA e a PspC, devido ao seu potencial em estimular a produção de anticorpos opsonicos (FROLET et al., 2010; KADIOGLU et al., 2008).

1.3.6.1 Autolisina (*LytA*)

A autolisina (N-acetil-muramoil-L-alanina amidase) é uma enzima ancorada à parede celular através de interações com resíduos de colina em moléculas de ácidos teicóico e lipoteicóico (KADIOGLU et al., 2008; MARTNER et al., 2009).

A autolisina confere uma característica peculiar ao pneumococo, permitindo a sua autólise ao atingir a fase estacionária de seu crescimento. Esse processo de autólise mediado pela autolisina ocorre através da síntese e degradação do peptidoglicano da parede celular mostrando, então, o seu envolvimento na divisão celular do microrganismo (MARTNER et al., 2009; WHATMORE; DOWSON, 1999).

Sendo assim, a autolisina apresenta um papel direto na patogênese através da liberação de produtos de degradação da parede celular e de membrana, tais como fragmentos de peptidoglicano solúveis e ácido lipoteicóico que induzem a resposta inflamatória, assim como um papel indireto através da lise e liberação de fatores de virulência como a pneumolisina, que não é liberada ativamente da célula (MARTNER et al., 2009; WHATMORE; DOWSON, 1999).

1.3.6.2 Antígeno de superfície pneumocócica A (PsaA)

PsaA é uma lipoproteína de 35 kDa localizada na superfície de *S. pneumoniae*, sendo inicialmente identificada em uma cepa não encapsulada (DOUCE et al., 2010; MIYAJI et al., 2002; SWIATLO; WARE, 2003).

Por apresentar seqüência homóloga à adesinas estreptocócicas, foi inicialmente denominada adesina de superfície pneumocócica A. É responsável pelo transporte de magnésio e zinco no citoplasma da célula bacteriana (JEDRZEJAS, 2001; SWIATLO; WARE, 2003).

A PsaA apresenta papel de aderência à mucosa do hospedeiro, através da sua ligação à resíduos de N-acetil-glicosamina em células endoteliais, atuando nos estágios iniciais da infecção mostrando-se, então, eficaz na proteção de modelos animais protegendo, principalmente, contra a colonização nasofaríngea com redução da recuperação de pneumococos no lavado brônquico e no sangue de animais infectados. Também foi observada a sua ligação à adesina E-caderina de matriz extracelular (BOGAERT et al., 2004; DOUCE et al., 2010; FROLET et al., 2010; JENSCH et al., 2010; LIN et al., 2010; MIYAJI et al., 2002).

É altamente conservada, estando presente em mais de 90 sorotipos testados até o momento. Essa ocorrência generalizada nos diversos sorotipos pneumocócicos, a torna um interessante candidato vacinal, capaz de fornecer uma ampla cobertura das infecções pneumocócicas (DOUCE et al., 2010; MIYAJI et al., 2002; SWIATLO; WARE, 2003).

A nasofaringe é geralmente considerada o principal reservatório humano de pneumococos. Desta forma, a proteção contra a colonização nasofaríngea é considerada essencial para indução da imunidade indireta na população, assim como é esperado que a redução na colonização exerça um efeito direto na redução da doença invasiva (BRILES et al., 2003; FUKUYAMA et al., 2010).

Portanto, com o aumento do conhecimento sobre os mecanismos de colonização, as proteínas de superfície pneumocócicas tornaram-se potenciais candidatos vacinais a serem estudados. Apesar das proteínas de superfície, tais como a Ply e a PspA conferirem proteção contra doenças sistêmicas, o PsaA e a PspC apresentam-se como candidatos promissores na prevenção da colonização pneumocócica (BOGAERT et al., 2004).

Desta forma, uma melhor proteção contra a colonização e infecção por *S. pneumoniae* poderia ser esperada, quando uma combinação de proteínas com funções distintas na virulência são utilizadas onde, de fato, estudos anteriores, demonstraram que a imunização da mucosa com PsaA e, em menor extensão, com PspA foi capaz de proteger contra a colonização nasofaríngea. No entanto, melhores níveis de proteção foram atingidos através da imunização de camundongos com as duas as proteínas (BOGAERT et al., 2004; BRILES et al., 2003; MIYAJI et al., 2002).

1.3.6.3 Adesinas de Superfície Pneumocócica

Dentre as adesinas de virulência pneumocócica destacam-se o fator de virulência e aderência A (PavA), o fator de virulência e aderência B (PavB) e a enolase (Eno). Por serem adesinas de superfície, contribuem para a colonização pneumocócica e infecções das vias respiratórias (JENSCH et al., 2010; KADIOGLU et al., 2008).

Se ligam à proteínas de matriz extracelular (MEC), onde observou-se a ligação de PavA à fibronectina, da enolase à plasminogênio e de PavB à ambas (JENSCH et al., 2010; KADIOGLU et al., 2008).

Estudos realizados com pneumococos mutantes para estas adesinas têm mostrado a sua importância na virulência de pneumococos, onde a ausência destas adesinas reduziu de forma significativa a recuperação de pneumococos em modelos de infecção respiratória aumentando, também, a sobrevivência dos animais (JENSCH et al., 2010; KADIOGLU et al., 2008).

1.3.6.4 Proteína de Superfície Pneumocócica C (PspC)

A PspC é uma proteína de 59-105 kDa paróloga à PspA sendo, também, um fator de virulência encontrado em todos os isolados de pneumococo, demonstrando importância em modelos de colonização nasofaríngea, septicemia e pneumonia. Desta forma, a imunização tanto com a PspC como com a PspA pode conferir proteção eficaz contra DPI (BALACHANDRAN et al., 2002; BRILES et al., 1998; YUSTE et al., 2010).

Apresenta três domínios estruturais semelhantes aos da PspA, incluindo um domínio de α -hélice N-terminal seguido por uma região rica em prolina e um domínio

de ligação à colina. A seqüência N-terminal é altamente variável, sendo o local das atividades específicas destas proteínas. Portanto, a maior diferença entre ambas está no domínio de α -hélice, onde tanto a região rica em prolina como o domínio de ligação à colina são indistingüíveis (BALACHANDRAN et al., 2002; BRILES et al., 1998; KADIOGLU et al., 2008).

É altamente polimórfica e exerce diversas funções, sendo também conhecida por outros nomes, os quais refletem as suas diferentes atividades (KADIOGLU et al., 2008). Sendo assim, a PspC também é conhecida como proteína de ligação à colina A (CbpA), onde mutantes que não expressam PspC apresentam capacidade reduzida de ligação à células epiteliais *in vitro*, mostrando redução da colonização nasofaríngea em relação à pneumococos selvagens (BALACHANDRAN et al., 2002; KADIOGLU et al., 2008).

A PspC também se liga ao receptor polimérico de imunoglobulina (pIgR), que normalmente transporta IgAs. Desta forma, também é chamada de SpsA (proteína secretora de superfície pneumocócica A). Essa atividade possibilita a translocação do pneumococo através do epitélio respiratório da nasofaringe, o que é consistente com a virulência reduzida de mutantes que não expressam PspC em modelos murinos de pneumonia (BALACHANDRAN et al., 2002; BOGAERT et al., 2004; CAO et al., 2010; KADIOGLU et al., 2008).

A PspC também interage com o complemento através da sua capacidade de ligação ao fator H, um regulador negativo da via alternativa de ativação do complemento impedindo, então, a formação de C3b pela C3 convertase desta via, evitando a opsonização pneumocócica. A PspC também liga o componente C3 do complemento, inibindo a ativação do sistema complemento na superfície do pneumococo (BALACHANDRAN et al., 2002; KADIOGLU et al., 2008, YUSTE et al., 2010).

1.3.6.5 *Proteína de Superfície Pneumocócica A (PspA)*

Primeiramente descrita em 1984 por McDaniel et al. (1984), a PspA é uma proteína que pode variar de aproximadamente 67 a 99 kDa (JEDRZEJAS; LAMANI; BECKER, 2001).

A PspA está presente em todos os isolados pneumocócicos, sendo a proteína mais estudada entre as proteínas protetoras de *S. pneumoniae* (ALBEYTA; HARDY; YOTHER, 2003; NABORS et al., 2000).

A sua importância na virulência tem sido estabelecida em modelos murinos de infecção pneumocócica através da utilização de pneumococos mutantes que não expressam PspA, onde pôde ser observado que a PspA é requerida para a virulência completa do pneumococo (MCDANIEL et al., 1987).

A PspA é exposta externamente à cápsula polissacarídica, onde estudos estruturais mostraram que a PspA possui uma carga polar eletropositiva, resultando na estabilidade da cápsula e na sua conseqüente exposição na superfície celular, ao passo que a sua carga eletronegativa terminal torna-se responsável pela inibição da ativação do sistema complemento na superfície bacteriana (CAO et al., 2007; DANIELS et al., 2006; JEDRZEJAS, 2001; OGUNNYI et al., 2007).

Desta forma, ao interferir na opsonização mediada pelo componente C3 do complemento na superfície do pneumococo, a PspA impede a opsonofagocitose e o “clearance” do microrganismo na corrente sangüínea. Portanto, anticorpos anti-PspA superam o efeito inibitório da PspA aumentando a deposição de complemento, indicando que o papel destes anticorpos poderia ser o mascaramento de domínios e epitopos responsáveis por esta função (KADIOGLU et al., 2008; MCDANIEL et al., 1987; REN et al., 2003; REN et al., 2004).

A PspA também funciona como um receptor para lactoferrina sendo, portanto, importante para a proteção do pneumococo da atividade bactericida da apolactoferrina (GILLESPIE; BALAKRISHNAN, 2000; KADIOGLU et al., 2008).

A lactoferrina é uma glicoproteína presente em secreções mucosas, onde é responsável pelo transporte de ferro, quelando-o e tornando-o indisponível para microrganismos. No entanto, a PspA não consegue seqüestrar ferro da lactoferrina. Desta forma, foi proposto que a PspA atue diretamente sob a ação bactericida da apolactoferrina (lactoferrina sem ferro ligado) (HAKANSSON et al., 2001; LING; SCHRYVERS, 2006).

A apolactoferrina sofre clivagem proteolítica liberando peptídeos bactericidas conhecidos como lactoferrinas que, por sua vez, desestabilizam a membrana do pneumococo. A PspA impede o acesso de lactoferrinas à membrana e, assim, o pneumococo permanece protegido. A PspA também se liga à lactoferrina ligada a apolactoferrina, impedindo a sua proteólise (LING; SCHRYVERS, 2006).

Portanto, pneumococos que não expressam PspA são mais sensíveis à morte pela apolactoferrina e anticorpos anti-PspA aumentam a sua atividade bactericida. Sendo assim, além da imunização com PspA proteger contra DPI, ela também auxilia na redução da colonização pneumocócica, através da ativação dos mecanismos de “clearance” mediados pela apolactoferrina (SHAPER et al., 2004).

A PspA apresenta 5 domínios, incluindo: (1) um peptídeo sinal, (2) uma região N-terminal de alfa-hélice que contém a maior parte dos epitopos imunogênicos e antigenicamente variáveis (aminoácidos 1 à 288), (3) uma região rica em prolina (aminoácidos 289 à 370), (4) um domínio de ligação à colina (aminoácidos 371 à 571), importante para ancorar a proteína à bactéria e, (5) uma cauda de colina C-terminal (aminoácidos 572 à 589). A cauda de colina se encontra ancorada à parede celular do pneumococo, não sendo exposta na sua superfície e, desta forma, não se encontra acessível ao reconhecimento por anticorpos, não sendo necessária para o desenvolvimento de resposta imune (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000; DANIELS et al., 2006). Desta forma, o fragmento do gene da PspA normalmente inserido em vetores para expressão heteróloga não possui a informação para a cauda de colina. A **Figura 9** esquematiza a relação entre a PspA e as demais moléculas de superfície de *S. pneumoniae* e a **Figura 10** mostra os domínios estruturais da PspA.

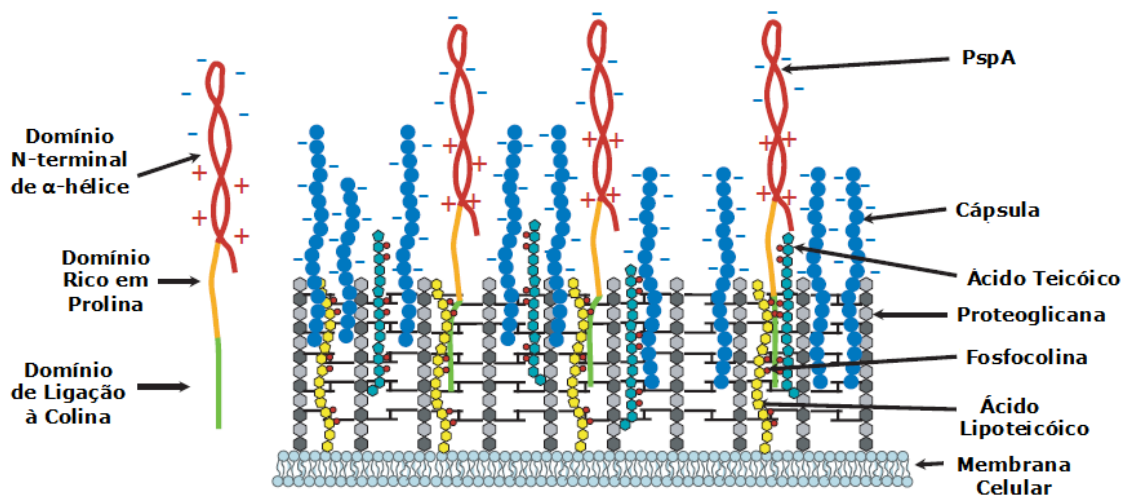


Figura 9: Esquema das possíveis interações entre a PspA e outras moléculas de superfície de *S. pneumoniae*. A PspA é ancorada à parede celular da bactéria através do seu domínio de ligação à colina. A porção eletropositiva da PspA interage com a porção eletronegativa do PS capsular, determinando a sua conformação e exposição na superfície da bactéria. Fonte: Adaptado de Daniels et al. (2006).

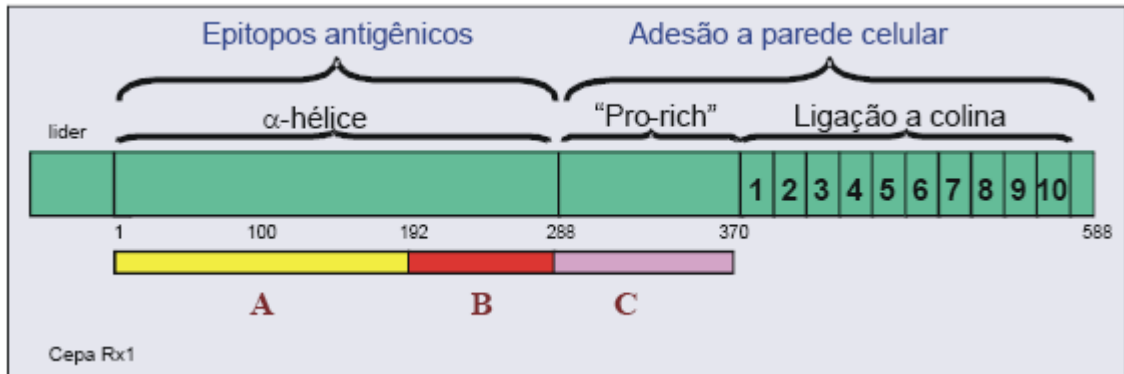


Figura 10: Esquema dos domínios estruturais da PspA. A barra estreita correspondente às letras A, B e C evidencia os fragmentos clonados no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

Fonte: Carvalho Jr (2009).

Como anteriormente citado, a PspA apresenta alto grau de variabilidade sorológica na sua seqüência N-terminal exposta, em especial nos últimos 100 aminoácidos, conhecida como “região definidora de clado” (CDR). Com base nas variações na CDR, a PspA foi dividida em 3 famílias e subdividida em 6 clados, de acordo com o grau de identidade e alinhamento destes aminoácidos. A família 1 é representada pelos clados 1 e 2, a família 2 pelos clados 3, 4 e 5, e a família 3 pelo clado 6, onde entre famílias a diferença de identidade nesta região é superior a 45%, e entre clados esta diferença é de 20% (HOLLINGSHEAD; BECKER; BRILES, 2000).

As PspAs das famílias 1 e 2, especialmente os clados de 1 à 4, são predominantes em todo o mundo onde, no Brasil, estão presentes em pelo menos 95% dos isolados clínicos (VELA-CORAL et al., 2001; BRANDILEONE et al., 2004).

No ano de 2004, Brandileone et al. analisaram 324 pneumococos, selecionados de uma coleção de 6.450 isolados invasivos e 42 isolados de nasofaringe, obtidos durante um programa de vigilância epidemiológica no Brasil, durante o período de 1977-2002. Estes isolados representavam 31 dos sorotipos pneumocócicos. Considerando os pneumococos invasivos, verificou-se que 51,9% pertenciam à família 1 e 43,2% à família 2. Entre os isolados de nasofaringe, 40,5% foram sorotipados como representantes da família 1 e 42,8% como da família 2.

No ano de 2006, um estudo epidemiológico realizado em Goiânia demonstrou que a diversidade genética da PspA em isolados pneumocócicos de nasofaringe no Brasil é semelhante ao observado em outros países, mostrando uma incidência de aproximadamente 50% de PspA da família 1 e 50% de PspA da família 2, enquanto

a PspA pertencente à família 3 foi raramente presente nos isolados. No entanto, as PspAs pertencentes aos clados 1 e 3 foram as mais prevalentes (HOLLINGSHEAD et al., 2006; PIMENTA et al., 2006).

Portanto, a diversidade observada para a PspA torna importante a análise de cada fragmento da proteína para avaliar se, de fato, o fragmento selecionado é capaz de induzir proteção cruzada.

Sendo assim, alguns estudos já vêm demonstrando que, apesar das diferenças sorológicas relacionadas à variabilidade genética da PspA, a imunização com uma única molécula de PspA pode proteger camundongos e humanos tanto contra PspA como contra cápsula heterólogas (DANIELS et al., 2010; NABORS et al., 2000). De forma semelhante, Briles et al. (2000) mostraram que o soro de humanos imunizados com um único fragmento recombinante de PspA protegeu passivamente camundongos de infecção fatal contra *S. pneumoniae* expressando diferentes famílias de PspA.

Além disso, foi demonstrado que tanto a imunização ativa com fragmentos completos ou truncados como a imunização passiva com anticorpos anti-PspA é capaz de proteger modelos murinos contra a infecção pneumocócica por diferentes sorotipos capsulares (MCDANIEL et al., 1991; TART et al., 1996).

A imunização parenteral com PspA é capaz de proteger modelos murinos contra pneumonia pneumocócica e sepse (BRILES et al., 2003).

A imunização nasal com a PspA resultou em aumento nas respostas de IgA anti-PspA específica a nível de mucosa e de IgG sistêmica em modelos murinos. Além disso, esses camundongos vacinados não foram colonizados por pneumococos, mostrando claramente que a IgA anti-PspA desempenha um papel fundamental na prevenção da colonização pneumocócica da mucosa nasal (FUKUYAMA et al., 2010). Outros autores também demonstraram anteriormente que vacinas contendo PspA podem proteger contra a colonização pneumocócica em camundongos (ARULANANDAM et al., 2001; OGUNNIYI et al., 2007).

Em 2008, Darrieux et al. avaliaram por Western Blotting o grau de reatividade cruzada de anticorpos contra fragmentos recombinantes compostos pelas regiões N-terminal e rica em prolina entre as famílias prevalentes de PspA. Neste estudo foi observado que o soro anti-PspA1 era capaz de reagir de forma cruzada com cepas expressando PspA2 fornecendo, então, cobertura completa para a família 1, enquanto o soro anti-PspA2 reagia apenas com cepas expressando PspA2. Já para

a família 2, foi observado que tanto a PspA4 como a PspA5 foram capazes de produzir anticorpos com ampla reatividade cruzada, reconhecendo cepas expressando PspA dos clados 1-5. No entanto, o soro anti-PspA3 mostrou reatividade restrita para pneumococos expressando o clado 3.

Em resumo, a vacina protéica, além de ser capaz de abranger uma maior cobertura, ela também apresenta a vantagem de ser mais barata do que as vacinas conjugadas, permitindo a sua utilização em países em desenvolvimento (NABORS et al., 2000). Desta forma, as formulações usualmente propostas para vacinas de PspA são baseadas na reatividade cruzada entre os clados da mesma família, resultando na inclusão de um ou mais componentes das duas famílias prevalentes ou da fusão destas proteínas, a fim de se obter um amplo espectro de proteção (DARRIEUX et al., 2007).

No entanto, deve ser enfatizado que a imunidade protetora é conferida por anticorpos sorotipo-específicos e que o efeito protetor de anticorpos contra proteínas pneumocócicas em seres humanos ainda está sob avaliação (WHO, 2003).

Sendo assim, a idéia do projeto temático, cujo presente trabalho faz parte, consiste na obtenção de uma formulação de vacina trivalente com um preço mais acessível, viabilizando a sua utilização em campanhas de vacinação em massa no Brasil. Para tal, serão primeiramente avaliados conjugados com os 3 sorotipos pneumocócicos prevalentes no país (14, 6B e 1) individualmente, onde espera-se que a utilização da PspA1 seja capaz de cobrir a família 1, enquanto a PspA4 venha a cobrir os clados 4 e 5 e a PspA3 possa garantir a cobertura para pneumococos expressando PspA do clado 3. Tal abordagem parece ser interessante em termos de cobertura ideal, abrangendo aproximadamente 100% de cobertura para as linhagens de cepas de *S. pneumoniae* das famílias 1 e 2 no país. No entanto, a fusão da PspA à pneumolisina também poderá ser futuramente avaliada para sua utilização como carreador protéico.

2 JUSTIFICATIVA

Entre as doenças invasivas mais graves causadas pelo *S. pneumoniae* estão a pneumonia e a meningite. No Brasil, embora dados sobre a incidência das doenças pneumocócicas sejam escassos, é possível afirmar que os maiores coeficientes de incidência de meningite pneumocócica são registrados em lactentes menores de 1 ano, apresentando uma taxa anual de incidência de 10 casos/100.000 crianças.

A imunização de crianças não está atualmente disponível como parte do Programa Nacional de Imunização expandida em nenhum país da América Latina e do Caribe. Para a rede privada estão disponíveis atualmente dois tipos de vacinas, a 23-valente – Pneumovax[®] – constituída de polissacarídeos livres de 23 sorotipos e as vacinas conjugadas Prevenar 7[®], Synflorix[™] e Prevenar 13[®]. A primeira vacina tem sido ocasionalmente aplicada em idosos em campanhas de vacinação e custa em torno de R\$70,00 em laboratórios particulares. Já o custo das vacinas conjugadas para crianças varia em torno de R\$250,00 à R\$300,00 de acordo com a formulação. Este custo mesmo que reduzido devido à compra pelo governo, como no caso da Synflorix[™], parece ser problemático para a sua inclusão em campanhas de vacinação, tendo em vista os problemas já anteriormente relatados em relação a prevalência de novos sorotipos capsulares e carreadores protéicos utilizados, além do número de doses necessárias para se obter a proteção esperada.

Uma nova abordagem que seria capaz de eliminar tais inconvenientes, envolve o uso de proteínas pneumocócicas de superfície com capacidade de reagir de forma cruzada, protegendo contra a colonização de cepas independentemente do seu sorotipo capsular.

Portanto, o projeto de conjugação dos 3 polissacarídeos capsulares mais prevalentes no país à PspA otimizando, também, a metodologia de conjugação química empregada, é uma tentativa de desenvolvimento de uma vacina trivalente cujo preço seja viável para ser adquirida pelo estado para ser utilizada em campanhas de vacinação em massa e não teria os inconvenientes apontados anteriormente.

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais

Obtenção de uma vacina conjugada entre o polissacarídeo capsular sorotipo 14 de *Streptococcus pneumoniae* e a proteína de superfície pneumocócica A do clado 3 (PS14-PspA3), assim como a avaliação das propriedades imunológicas humorais deste antígeno vacinal.

3.2 Específicos

- Utilização de uma nova metodologia de conjugação química para obtenção de antígenos vacinais, otimizando o rendimento do processo e, permitindo, a obtenção de uma vacina anti-pneumocócica com custo-benefício reduzido.
- Utilização de uma proteína pneumocócica exposta com capacidade de induzir resposta imune cruzada, a fim de reduzir o número de polissacarídeos em uma formulação de vacina conjugada permitindo, também, a redução do seu custo, assim como a redução da taxa de substituição dos sorotipos prevalentes através da obtenção de uma maior cobertura vacinal em função da proteína carreadora.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

O PS14 utilizado neste trabalho foi adquirido da ATCC – *The American Type Culture Collection* – (Merck & Co., Manassas, VA., USA).

A rPspA3 foi fornecida pela Dra. Viviane Maimoni Gonçalves do Laboratório de Fermentação do Instituto Butantan, onde o fragmento do gene *pspA3* foi inserido em *E. coli* BL21(DE3) utilizando o plasmídeo pET37b⁺. O cultivo e a purificação desta construção foram realizados de acordo com Carvalho Jr (2009).

4.2 Cepas Bacterianas e Condições de Crescimento

As cepas bacterianas utilizadas neste trabalho – St245/00 (PS14/PspA1); P630 (PS14/PspA1); P275/97 (PS3/PspA3) e P679/99 (PS6B/PspA3) – foram cedidas pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, S.P., Brasil) e mantidas como estoques congelados à -80 °C em meio Todd-Hewitt (BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J., USA) suplementado com 0,5% de extrato de levedura (THY) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA) contendo 10% de glicerol (USB[®] Corporation, Cleveland, OH., USA). Para todos os experimentos, estes isolados foram plaqueados em ágar-sangue (Instituto Butantan, São Paulo, S.P., Brasil) em atmosfera rica em CO₂ e, em seguida, crescidos em meio THY até atingirem DO_{600nm} de 0,4 à 0,5 (concentração de aproximadamente 10⁸ CFU/mL).

4.3 Ativação do PS14

4.3.1 Hidrólise

A metodologia adotada para clivagem do PS14 (ATCC) foi a hidrólise ácida, empregando ácido clorídrico (HCl) (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., Diadema, S.P., Brasil) na concentração de 0,5M para concentração de 5mg/mL de PS14.

A reação foi realizada em sistema de refluxo à 80 °C por 30 minutos sob agitação e interrompida com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) (Casa da Química Ind. e Com. Ltda., Diadema, S.P., Brasil), atingindo-se pH neutro (pH 7,0).

A massa molar média dos fragmentos de polissacarídeo gerados após hidrólise foi determinada através de cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-400 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Uppsala, Sweden) calibrada com dextranas de 10, 40, 70, 229 kDa e Blue Dextran (2.000 kDa) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Höester, Germany) (**ANEXO A**). O fluxo de trabalho foi de 1mL/min e como fase móvel utilizou-se cloreto de sódio 0,2M (NaCl) (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, S.P., Brasil), coletando-se frações de 3mL/tubo.

O perfil cromatográfico e a quantificação de PS14 hidrolisado a fim de se avaliar a massa molar média e o rendimento da reação de hidrólise, respectivamente, foram realizados pelo Método Fenol Sulfúrico otimizado, que consiste no método de dosagem descrito por Dubois et al. (1956) e otimizado por Cuesta et al. (2003) (detalhado a seguir em *métodos analíticos* – **seção 4.7.1.1**).

4.3.2 Oxidação

O PS14 previamente hidrolisado ([PS14hid] = 10mg/mL) foi oxidado com 10mM de meta-periodato de sódio (NaIO₄) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO., USA) em tampão fosfato dibásico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA) na concentração de 10mM, atingindo-se pH 7,5.

A reação foi realizada no escuro e sob agitação por 30 minutos. Logo após, a reação foi interrompida com glicerol (USB[®] Corporation) com um excesso de dez vezes em número de mols de glicerol em relação ao número de mols de NaIO₄ utilizado.

Ao término da reação, o PS14 oxidado (PS14oxi) foi purificado através de diálise contra água e a quantificação dos grupos aldeídicos resultantes da reação de oxidação foram determinados pelo método do ácido bicinchonínico (Pierce[®], Rockford, IL., USA) ou “*Método BCA*” (**seção 4.7.2.1**), descrito por Tyllianakis et al. (1994) empregando-se glicose (Merck S.A., Rio de Janeiro, R.J., Brasil) como padrão.

A massa molar média do PS14oxi foi determinada através de cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-400 (GE Helthcare Bio-Sciences AB) e tanto a avaliação do perfil cromatográfico como a quantificação de PS14oxi para

estimativa do rendimento da reação de oxidação foram realizadas pelo Método Fenol Sulfúrico otimizado (CUESTA et al., 2003).

4.3.3 Derivatização

O PS14oxi foi derivatizado com a diidrazida do ácido adípico (ADH) (Sigma Chemical Co.) como molécula espaçadora na presença de cianoborohidreto de sódio (NaCNBH_3) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO., USA), ambos em um excesso de cinquenta vezes em número de mols em relação ao número de mols de aldeído.

O ADH foi adicionado diretamente ao meio reacional, enquanto 5M NaCNBH_3 foi adicionado em NaOH 0,2% (Casa da Química Ind. e Com. Ltda.). A reação foi realizada em tampão fosfato dibásico 10mM (pH 7,5), permanecendo sob agitação durante 24 horas.

A reação foi interrompida com uma solução de borohidreto de sódio (5M NaBH_4) (Sigma Chemical Co.) em um excesso de dez vezes em número de mols de NaBH_4 em relação ao número de mols de aldeído inicial em NaOH 0,2%.

O PS14 derivatizado (PS14-ADH) foi purificado através de cromatografia de exclusão molecular em resina Sephadex G-25 (GE Helthcare Bio-Sciences AB). O fluxo de trabalho foi de 10mL/min e como fase móvel utilizou-se H_2O , coletando-se frações de 5mL/tubo.

A dosagem de ADH foi realizada pelo método do ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (Sigma Chemical Co.) ou “Método TNBS” (**seção 4.7.3.1**), descrito por Qi, Keyhani e Lee (1988).

A massa molar média do PS14-ADH foi determinada através de cromatografia de exclusão molecular em resina Sephacryl S-400 (GE Helthcare Bio-Sciences AB) e tanto a avaliação do perfil cromatográfico como a quantificação de PS14-ADH para estimativa do rendimento da reação de derivatização foram realizadas pelo Método Fenol Sulfúrico otimizado (CUESTA et al., 2003).

4.4 rPspA3

4.4.1 Modificação da rPspA3 nativa

A modificação da rPspA3 nativa foi realizada com 2% de formaldeído à 37% (Merck S.A.) para concentração de 20mg/mL de rPspA3, empregando-se 10 μ L de NaCNBH₃ 5M (Sigma-Aldrich Co.) em NaOH 1M (Casa da Química Ind. e Com. Ltda.) por mL de reação (pH 7,5).

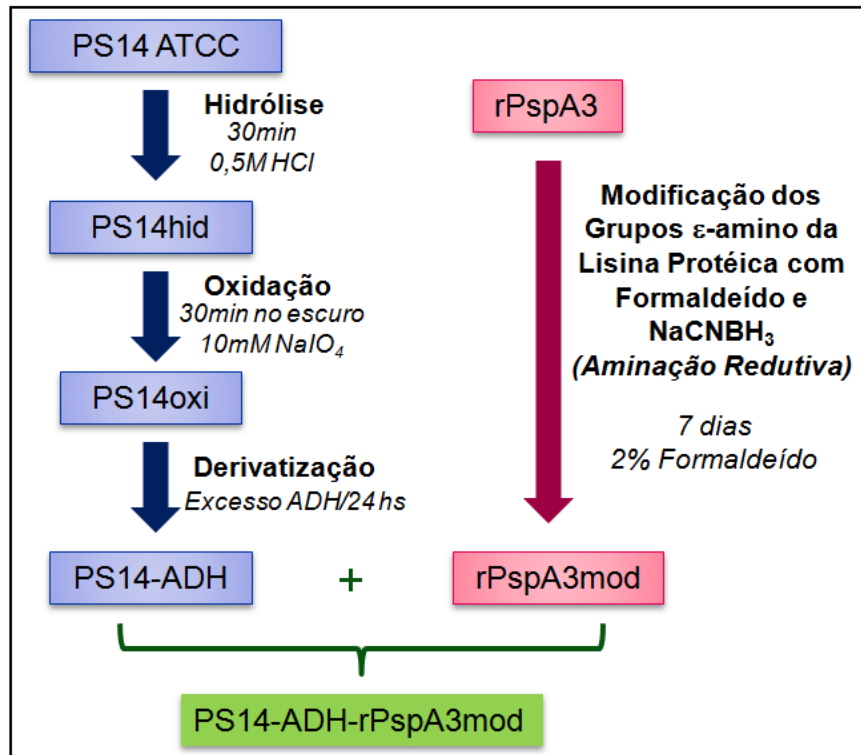
A reação permaneceu sob agitação durante sete dias e a rPspA3 modificada (rPspA3mod) foi purificada através de diálise contra tampão fosfato dibásico 10mM (pH 7,5) e a quantificação dos grupos ϵ -amino das lisinas protéicas restantes foi realizada pelo Método TNBS (QI; KEYHANI; LEE, 1988).

A quantificação de rPspA3mod para estimativa do rendimento da reação de modificação foi realizada pelo Método BCA (TYLLIANAKIS et al., 1994) empregando-se albumina (Sigma Chemical Co.) como padrão.

4.5 Conjugação do PS14-ADH com a rPspA3mod

A reação de conjugação entre o PS14 ativado (PS14-ADH) e a rPspA3mod foi realizada em tampão fosfato dibásico 10mM (pH 7,5) na presença de 50mM do ativador DMT-MM (Sigma Chemical Co.) e 0,3M de NaCl (Dinâmica Química Contemporânea Ltda.) durante 24 horas. A relação em massa utilizada foi de 1:1 de PS14-ADH para rPspA3mod, ambos na concentração de 15mg/mL.

O **Esquema 8** mostra todas as etapas reacionais para obtenção do conjugado entre o PS14-ADH e a rPspA3mod (PS14-rPspA3).



Esquema 8: Ilustração das Etapas Reacionais para Obtenção do conjugado PS14-rPspA3.

4.6 Purificação do Conjugado PS14-rPspA3

4.6.1 Cromatografia de Interação Hidrofóbica (CIH)

A resina selecionada para purificação do conjugado foi a Phenyl-Sepharose Fast Flow (High Sub) (GE Healthcare Bio-Sciences AB) e a corrida foi realizada em três etapas: 1) Equilíbrio com uma solução de sulfato de amônio 1M $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (Jand Química Ind. e Com. de Prod. Químicos Ltda., Jandira, S.P., Brasil); 2) Eluição em gradiente passando de 1M-0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 3) Eluição isocrática com H_2O .

4.7 Métodos Analíticos

4.7.1 Quantificação de Polissacarídeo

4.7.1.1 Método Fenol-Sulfúrico

O PS14 foi quantificado pelo Método Fenol Sulfúrico otimizado, que consiste no método de dosagem descrito por Dubois et al. (1956) e otimizado por Cuesta et al. (2003), onde dois pontos são alterados: a adição ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Merck

KGaA) pela parede do tubo, fazendo com que ele escorra através do mesmo e o maior tempo de permanência da amostra em banho-maria (30 minutos) para haver a quebra total do PS14. Ambos os procedimentos aumentaram a reprodutibilidade do método.

Sendo assim, foram aliqüotados 200µL da amostra (PS a ser quantificado), 200µL de uma solução de fenol 5% (Casa da Química Ind. e Com. Ltda.) e 1mL de H₂SO₄ concentrado, onde o último foi adicionado em banho de gelo. Após 10 minutos de permanência desta solução em banho de gelo, a mesma foi vortexada e incubada em banho-maria à 80 °C por 30 minutos. Por fim, os tubos são resfriados em banho de gelo e mantidos à temperatura ambiente por um período de 20 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490nm e a curva padrão foi determinada empregando-se PS14 nativo (ATCC) em concentrações variando entre 2,5µg a 40µg. A concentração das amostras foi calculada através da curva padrão, considerando-se o fator de diluição.

4.7.2 Quantificação de Aldeído e de rPspA3

4.7.2.1 Método BCA

O método baseia-se na habilidade do aldeído em reduzir Cu²⁺ para Cu⁺ formando um complexo quelante com o ácido bicinchonínico (BCA) (TYLLIANAKIS et al., 1994). Para tais dosagens, utilizou-se uma adaptação do método para a sua realização em microplaca, onde para a dosagem de aldeído adicionou-se 100µL de uma solução 50:1 de BCA e sulfato de cobre 4% (Neon, Ipiranga, S.P., Brasil) à 100µL de PS14oxi. Esta mistura foi posteriormente estocada por 1h à 80°C em estufa. A curva padrão foi determinada utilizando glicose (Merck S.A.) em concentrações entre 0,004µmol a 0,06µmol. Já para a dosagem de proteína, 100µL de uma solução contendo BCA e sulfato de cobre 4% (50:1) foi adicionada à 100µL de rPspA3 e estocada por 30 minutos à 80°C em estufa. A curva padrão foi determinada utilizando albumina (Sigma Chemical Co.) em concentrações entre 1µg a 60µg. Após o resfriamento, ambas as amostras foram lidas em comprimento de onda de 570nm em leitor Multiskan EX (Labsystems Uniscience, São Paulo, S.P., Brasil).

4.7.3 Quantificação de ADH e grupos ϵ -amino da rPspA3

4.7.3.1 Método TNBS

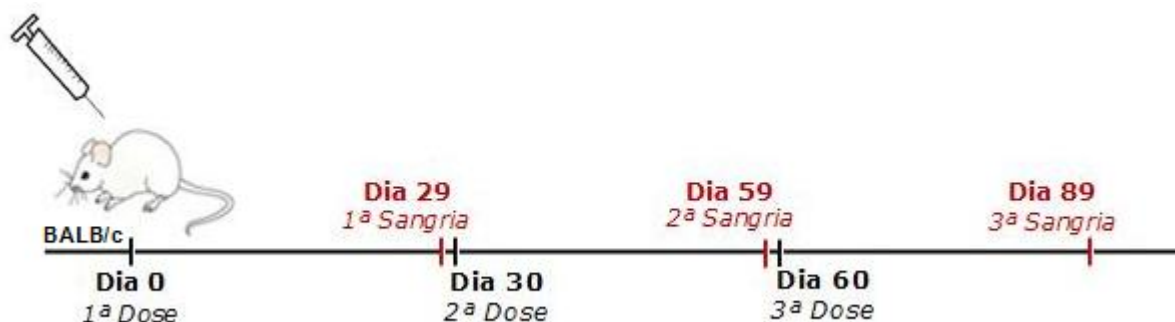
A concentração de ADH presente no PS-ADH assim como a concentração de grupos ϵ -amino livres na lisina da rPspA3 nativa e modificada foram determinadas pelo método TNBS descrito por Qi, Keyhani e Lee (1988) com algumas modificações para a sua realização em microplaca. Tal método apresenta especificidade de reação com grupos amino primários, resultando em um trinitrofenil (TNP)-derivado de coloração amarela, posteriormente determinado por espectrofotometria. Nesse ensaio, foi aliquotado 50 μ L de amostra, 50 μ L de uma solução saturada de borato de sódio (pH 8,0) (Casa da Química Ind. e Com. Ltda.) e 50 μ L de uma solução de TNBS 0,1% (Sigma Chemical Co.), seguida de incubação por 40 minutos à temperatura ambiente no escuro. A absorbância foi lida à 492nm em leitor Multiskan EX (Labsystems Uniscience) e a curva padrão foi determinada empregando-se ADH (Sigma Chemical Co.) em concentrações variando entre 0,3 μ g a 1,5 μ g.

4.8 Avaliação da Resposta Imune Humoral induzida pelo PS14-rPspA3

4.8.1 Esquema de Imunização

Camundongos BALB/c fêmeas de 7 semanas (aproximadamente 18g) fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan foram imunizados intraperitonealmente com 2,5 μ g/dose (referente à PS14) do conjugado PS14-rPspA, correspondendo à 5,5 μ g/dose de rPspA3mod co-administrado com 200 μ g de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃] (Instituto Butantan, São Paulo, S.P., Brasil) como adjuvante em um esquema de imunização de 3 doses. O intervalo entre as doses foi de 30 dias e amostras de sangue foram coletadas via plexo retroorbital no dia precedente às injeções de reforço (dias 29 e 59) e no dia 89.

O **Esquema 9** e a **Tabela 2** abaixo mostram o cronograma do esquema de imunização empregado e os respectivos grupos utilizados neste trabalho.



Esquema 9: Cronograma do esquema de imunização de camundongos BALB/c com o conjugado PS14-rPspA3.

Tabela 2 – Esquema de Imunização com o conjugado PS14-rPspA3 e seus respectivos grupos controle.

Grupos	Controles	Quantia/Dose	Nº de animais
G1	Salina	200µg Al(OH) ₃	5
G2	rPspA3	5,5µg + 200µg Al(OH) ₃	10
G3	rPspA3mod	5,5µg + 200µg Al(OH) ₃	10
G4	PS14 (ATCC)	2,5µg + 200µg Al(OH) ₃	10
G5	PS14 (ATCC) + rPspA3mod coadministrados	2,5µg + 5,5µg + 200µg Al(OH) ₃	10
G6	Conjugado PS14-rPspA3	2,5µg + 5,5µg + 200µg Al(OH) ₃	10

4.8.2 Determinação do Índice de Anticorpos

4.8.2.1 Titulação de IgG Anti-PS14 por ELISA

Os soros dos camundongos previamente imunizados foram avaliados individualmente quanto à produção de IgG sérico anti-PS14 por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) onde, para tal, foram utilizadas placas Nunc MaxiSorp™ de 96 poços (Nalge Nunc International, Rochester, N.Y., USA) sensibilizadas com 100µL de uma solução de PS14 (ATCC) diluída em tampão fosfato-salino (PBS - pH 7,2) na concentração de 50µg/mL, totalizando 5µg de PS14 por poço, seguida de incubação de 48 horas à 4 °C.

Após incubação, a placa foi lavada por três vezes com 200µL de uma solução de PBS acrescida de Tween 20 (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.) à

0,05% (PBS-T) e bloqueada com uma solução de leite desnatado Molico[®] 10% (Nestlé Brasil Ltda., Araçatuba, S.P., Brasil) diluída em PBS por 1h à 37 °C. Em seguida, a placa foi novamente lavada por três vezes com 200µL de uma solução de PBS-T e incubada com 100µL do soro (em duplicata; diluição seriada) diluído em PBS com 5% de Molico[®] por 2h à 37 °C. Logo após, a placa foi lavada com PBS-T e incubada com 100µL de uma solução de IgG anti-mouse conjugado à peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluído (1:1000) em PBS com 5% de Molico por 2h à 37 °C. Por fim, a placa foi lavada com PBS-T e incubada com 100µL de uma solução contendo 400µg/mL de orto-fenildiamina (OPD) (Sigma-Aldrich Inc.) e 5µL/mL de peróxido de hidrogênio 10% (Tayuyna Ltda., São Paulo, S.P., Brasil) em tampão citrato 0,1M à temperatura ambiente no escuro por 15 minutos. A reação foi interrompida com 50µL de H₂SO₄ 4M (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany) e a absorbância lida à 492nm em leitor Multiskan EX (Labsystems Uniscience).

O título foi estabelecido como sendo a diluição do soro onde D.O._{492nm} é igual à 0,1.

4.8.2.2 Titulação de IgG Anti-rPspA3 por ELISA

Os soros dos camundongos previamente imunizados também foram avaliados individualmente quanto à produção de IgG sérico anti-rPspA3 por ELISA onde, para tal, foram utilizadas placas Nunc MaxiSorp[™] de 96 poços (Nalge Nunc International) sensibilizadas com 100µL de uma solução de rPspA3 diluída em tampão fosfato-salino (PBS - pH 7,2) na concentração de 1µg/mL, totalizando 0,1µg de rPspA3 por poço, seguida de incubação “*overnight*” ou de 24 horas à 4 °C.

Após incubação, a placa foi lavada por três vezes com 200µL de uma solução de PBS acrescida de Tween 20 (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.) à 0,05% (PBS-T) e bloqueada com uma solução de leite desnatado Molico[®] 10% (Nestlé Brasil Ltda.) diluída em PBS por 1h à 37 °C. Em seguida, a placa foi novamente lavada por três vezes com 200µL de uma solução de PBS-T e incubada com 100µL do soro (em duplicata; diluição seriada) diluído em PBS com 5% de Molico[®] por 1h à 37 °C. Logo após, a placa foi lavada com PBS-T e incubada com 100µL de uma solução de IgG anti-mouse conjugado à peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluído (1:1000) em PBS com 5% de Molico por 1h à 37 °C. Por fim, a placa foi lavada com PBS-T e incubada com 100µL de uma solução contendo 400µg/mL de

OPD (Sigma-Aldrich Inc.) e 5µL/mL de peróxido de hidrogênio 10% (Tayuyua Ltda.) em tampão citrato 0,1M à temperatura ambiente no escuro por 15 minutos. A reação foi interrompida com 50µL de H₂SO₄ 4M (Merck KGaA) e a absorbância lida à 492nm em leitor Multiskan EX (Labsystems Uniscience).

O título foi estabelecido como sendo a diluição do soro onde D.O._{492nm} é igual à 0,1.

4.8.3 Determinação do Índice de Avidéz

O índice de avidéz (IA) dos anticorpos IgG anti-PS14 e anti-rPspA3 foi determinado por ELISA conforme descrito nos itens anteriores para determinação do índice total de IgG, porém com uma etapa adicional.

Após a incubação das placas com o “pool” dos soros (em duplicata) dos camundongos previamente imunizados, as mesmas foram lavadas por três vezes com solução PBS-T e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente com 100µL de PBS (controle) ou PBS contendo tiocianato de potássio (KSCN) 1,5M (Casa da Química Ind. e Com. Ltda.).

O índice de avidéz (IA) foi calculado conforme descrito por Perciani et al. (2007), onde o mesmo foi determinado pela razão entre os valores da densidade óptica das amostras tratadas com KSCN (K⁺) e não tratadas (K⁻) e expresso em porcentagem [IA = (K⁺/K⁻) x 100], sendo definido que anticorpos com IA acima de 50% apresentam alta avidéz (LEE; WANG; FRASCH, 2001).

4.8.4 Isotipagem de Anticorpos

4.8.4.1 Determinação das subclasses de IgG anti-PS14

Os “pools” dos soros dos camundongos previamente imunizados foram avaliados quanto à produção de IgG sérico anti-PS14 por ELISA onde, para tal, foram utilizadas placas Nunc MaxiSorp™ de 96 poços (Nalge Nunc International) sensibilizadas com 100µL de uma solução de PS14 (ATCC) diluída em tampão fosfato-salino (PBS - pH 7,2) na concentração de 50µg/mL, totalizando 5µg de PS14 por poço, seguida de incubação de 48hs à 4 °C.

Após incubação, a placa foi lavada por três vezes com 200µL de uma solução de PBS acrescida de Tween 20 (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.) à 0,05% (PBS-T) e bloqueada com uma solução de leite desnatado Molico[®] 10% (Nestlé Brasil Ltda., Araçatuba, S.P., Brasil) diluída em PBS por 1h à 37 °C. Em seguida, a placa foi novamente lavada por três vezes com 200µL de uma solução de PBS-T e incubada com 100µL do soro (em duplicata; diluição seriada) diluído em PBS com 5% de Molico[®] por 2h à 37 °C. Logo após, realizou-se uma nova incubação da placa com 100µL de uma solução de anticorpos anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b ou anti-IgG3 (Sigma Chemical Co.) de camundongo produzidos em cabra diluídos (1:1000) em PBS com 5% de Molico por 2h à 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas por 2h à 37 °C com 100µL de uma solução de anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase diluído (1:5000) em PBS com 5% de Molico. Por fim, a placa foi lavada com PBS-T e incubada com 100µL de uma solução contendo 400µg/mL de OPD (Sigma-Aldrich Inc.) e 5µL/mL de peróxido de hidrogênio 10% (Tayuyna Ltda., São Paulo, S.P., Brasil) em tampão citrato 0,1M à temperatura ambiente no escuro por 15 minutos. A reação foi interrompida com 50µL de H₂SO₄ 4M (Merck KGaA, Darmstadt, Hesse, Germany) e a absorbância lida à 492nm em leitor Multiskan EX (Labsystems Uniscience, São Paulo, S.P., Brasil).

O título foi estabelecido como sendo a diluição do soro onde D.O._{492nm} é igual à 0,1.

4.8.4.2 Determinação das subclasses de IgG anti-rPspA3

Os soros dos camundongos previamente imunizados também foram avaliados individualmente quanto à produção de IgG sérico anti-rPspA3 por ELISA, onde, para tal, foram utilizadas placas Nunc MaxiSorp[™] de 96 poços (Nalge Nunc International) sensibilizadas com 100µL de uma solução de rPspA3 diluída em tampão fosfato-salino (PBS - pH 7,2) na concentração de 1µg/mL, totalizando 0,1µg de rPspA3 por poço, seguida de incubação *overnight* ou de 24hs à 4 °C.

Após incubação, a placa foi lavada por três vezes com 200µL de uma solução de PBS acrescida de Tween 20 (Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda.) à 0,05% (PBS-T) e bloqueada com uma solução de leite desnatado Molico[®] 10% (Nestlé Brasil Ltda.) diluída em PBS por 1h à 37 °C. Em seguida, a placa foi novamente lavada por três vezes com 200µL de uma solução de PBS-T e incubada

com 100µL do soro (em duplicata; diluição seriada) diluído em PBS com 5% de Molico[®] por 1h à 37 °C. Logo após, realizou-se uma nova incubação da placa com 100µL de uma solução de anticorpos anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b ou anti-IgG3 (Sigma Chemical Co.) de camundongo produzidos em cabra diluídos (1:1000) em PBS com 5% de Molico por 1h à 37 °C. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas por 1h à 37 °C com 100µL de uma solução de anti-IgG de cabra conjugado à peroxidase diluído (1:5000) em PBS com 5% de Molico. Por fim, a placa foi lavada com PBS-T e incubada com 100µL de uma solução contendo 400µg/mL OPD (Sigma-Aldrich Inc.) e 5µL/mL de peróxido de hidrogênio 10% (Tayuyuna Ltda.) em tampão citrato 0,1M à temperatura ambiente no escuro por 15 minutos. A reação foi interrompida com 50µL de H₂SO₄ 4M (Merck KGaA) e a absorbância lida à 492nm em leitor Multiskan EX (Labsystems Uniscience).

O título foi estabelecido como sendo a diluição do soro onde D.O._{492nm} é igual à 0,1.

4.8.5 Deposição de Complemento

Primeiramente, realizou-se a inativação das proteínas do complemento dos “pools” dos soros dos camundongos previamente imunizados através de incubação por 30 minutos à 56 °C.

Pneumococos expressando PS14 e PspA3 foram crescidos em meio THY (BD Biosciences) até atingirem DO_{600nm} de 0,4 à 0,5 (concentração de aproximadamente 10⁸ CFU/mL) e centrifugados por 3 minutos à 2000 x g à 4 °C. Os pellets foram lavados, ressuspensos em PBS e incubados por 30 minutos à 37 °C na presença de 10% do “pool” dos soros dos diferentes grupos de camundongos imunizados (em duplicata), atingindo-se um volume final de 100µL. As bactérias foram novamente lavadas com PBS, centrifugadas e ressuspensas em 90µL de tampão gelatina veronal e incubadas à 37 °C por 30 minutos com 10% de fonte de complemento (soro de camundongo BALB/c). Após a incubação, as bactérias foram novamente lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos (em gelo e no escuro) com 100µL de anticorpo anti-C3 conjugado ao FITC (isotiocianato de fluoresceína) (MP Biomedicals, Cleveland, OH., USA), em uma diluição de 1:500. Por fim, a bactéria foi lavada duas vezes com PBS, centrifugada, ressuspensa em 1% de

formaldeído e estocada à 4 °C no escuro para posterior análise de citometria de fluxo por FACSCanto™ II (BD Biosciences).

4.8.6 Opsonofagocitose

4.8.6.1 Medida da Atividade Funcional de IgG anti-rPspA3

A atividade funcional fagocítica do soro dos camundongos imunizados com a rPspA3mod livre e conjugada foi avaliada através de um ensaio opsonofagocítico adaptado e otimizado por Goulart et al. (2011).

Sendo assim, primeiramente, realizou-se a inativação das proteínas do complemento dos “pools” dos soros dos camundongos previamente imunizados através de incubação por 30 minutos à 56 °C.

Pneumococos expressando PspA3 foram crescidos em meio THY (BD Biosciences) até atingirem DO_{600nm} de 0,4 à 0,5 (concentração de aproximadamente 10^8 CFU/mL) e centrifugados por 3 minutos à $2000 \times g$ à 4 °C. Os pellets foram lavados com PBS e ressuspensos em tampão de opsonofagocitose, contendo cálcio e magnésio. Em seguida, $2,5 \times 10^6$ UFC foram incubadas por 30 minutos à 37 °C na presença do “pool” dos soros dos diferentes grupos de camundongos imunizados em uma diluição final de 1:8 (em tampão de opsonofagocitose), atingindo-se um volume final de 100µL. Logo após, foi adicionado 10µL de fonte de complemento (soro de camundongo BALB/c) e as amostras foram incubadas à 37 °C por 30 minutos. Por fim, foram adicionadas 4×10^5 células peritoneais de camundongos BALB/c previamente estimulados com 10µg de concanavalina A (ConA) de *Canavalia ensiformis* (Sigma Chemical Co.) à 37 °C durante 45 minutos sob agitação horizontal à 220 RPM.

O estímulo das células peritoneais dos camundongos foi realizado 48 horas anteriormente ao experimento. As células peritoneais coletadas após lavagem peritoneal com 5mL de PBS gelado foram centrifugadas à $1000 \times g$ e ressuspensas em tampão de opsonofagocitose antes de serem adicionadas.

A reação foi interrompida em gelo por 5 minutos e as amostras foram diluídas em série, onde 10µL de cada diluição foi plaqueada em ágar-sangue (Instituto Butantan) em atmosfera rica em CO_2 . A fagocitose foi determinada pela contagem de *S. pneumoniae* viáveis após 18 horas.

4.8.7 Análise Estatística

Como já descrito anteriormente, os soros dos camundongos previamente imunizados foram avaliados quanto à produção de IgG sérico anti-PS14 e anti-rPspA3 individualmente dentro de cada grupo, onde a média geométrica e intervalos de confiança de 95% da média geométrica foram calculados. Para eliminar os efeitos da variabilidade de um animal para o outro, as comparações estatísticas foram realizadas com os valores dos títulos obtidos em log. Comparações entre os camundongos imunizados com o conjugado e os controles, assim como a contagem final de pneumococos viáveis no ensaio de opsonofagocitose foram realizadas por análise de variância (ANOVA fator único) juntamente com o teste de comparação múltipla de Tukey. A significância estatística foi estabelecida como $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ativação do PS14

5.1.1 Hidrólise

Polissacarídeos capsulares em sua forma nativa são polímeros com alta massa molecular e suas soluções tendem a ser viscosas. Desta forma, através da depolimerização, o polissacarídeo forma soluções mais fáceis de serem manipuladas e, além disso, a sua fragmentação também aumenta o número de resíduos terminais livres, aumentando a sua suscetibilidade de ataque por métodos que conjugam via resíduos terminais. Outra vantagem de se utilizar polissacarídeos de menor massa molar é a facilidade de purificação do produto final, o polissacarídeo conjugado (LEES; PUVANESARAJAH; FRASCH, 2008).

A **Figura 11** mostra os locais suscetíveis à hidrólise no PS14.

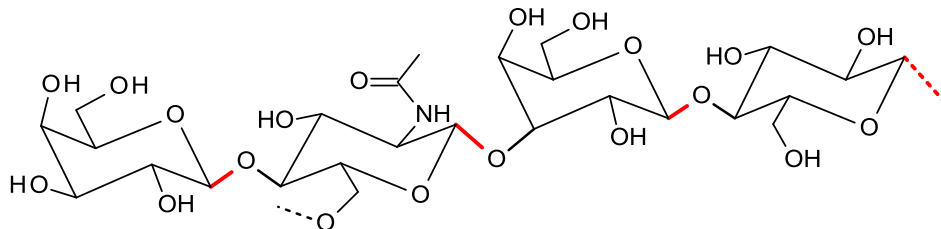


Figura 11: Subunidade de Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14 e suas ligações glicosídicas suscetíveis à ruptura por hidrólise ácida destacadas em vermelho.

Desta forma, o PS14 nativo (ATCC) foi hidrolisado em meio ácido em sistema de refluxo, permitindo a redução da sua massa molar média de em torno de 400 kDa para aproximadamente 50 kDa, sendo observado um perfil homogêneo e um rendimento médio de reação de hidrólise de 95%.

A **Figura 12** mostra o perfil cromatográfico do PS14 nativo e hidrolisado.

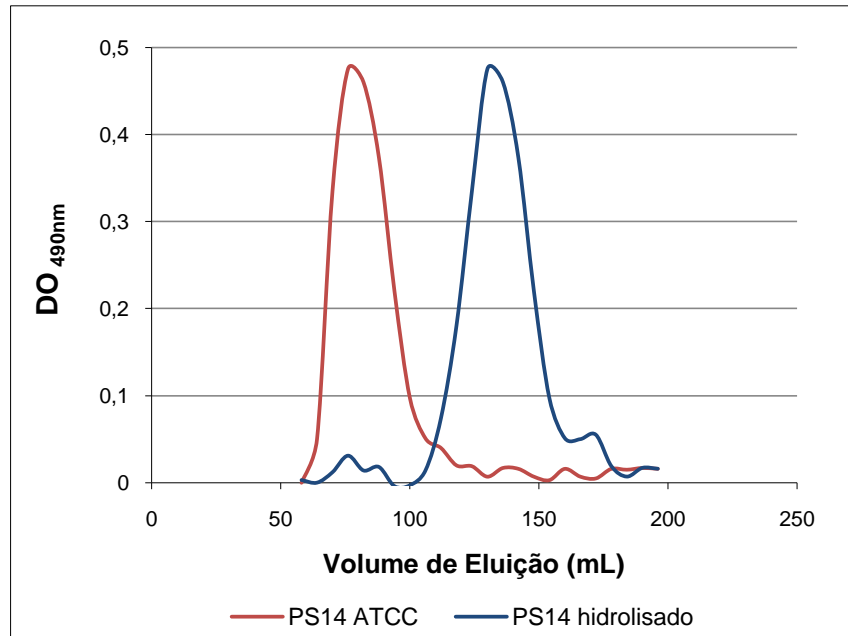


Figura 12: Cromatograma do PS14 nativo e hidrolisado em resina Sephacryl S-400. Fase móvel: NaCl 0,2M. Fluxo: 1mL/min.

5.1.2 Dosagem de grupos amino no PS hidrolisado

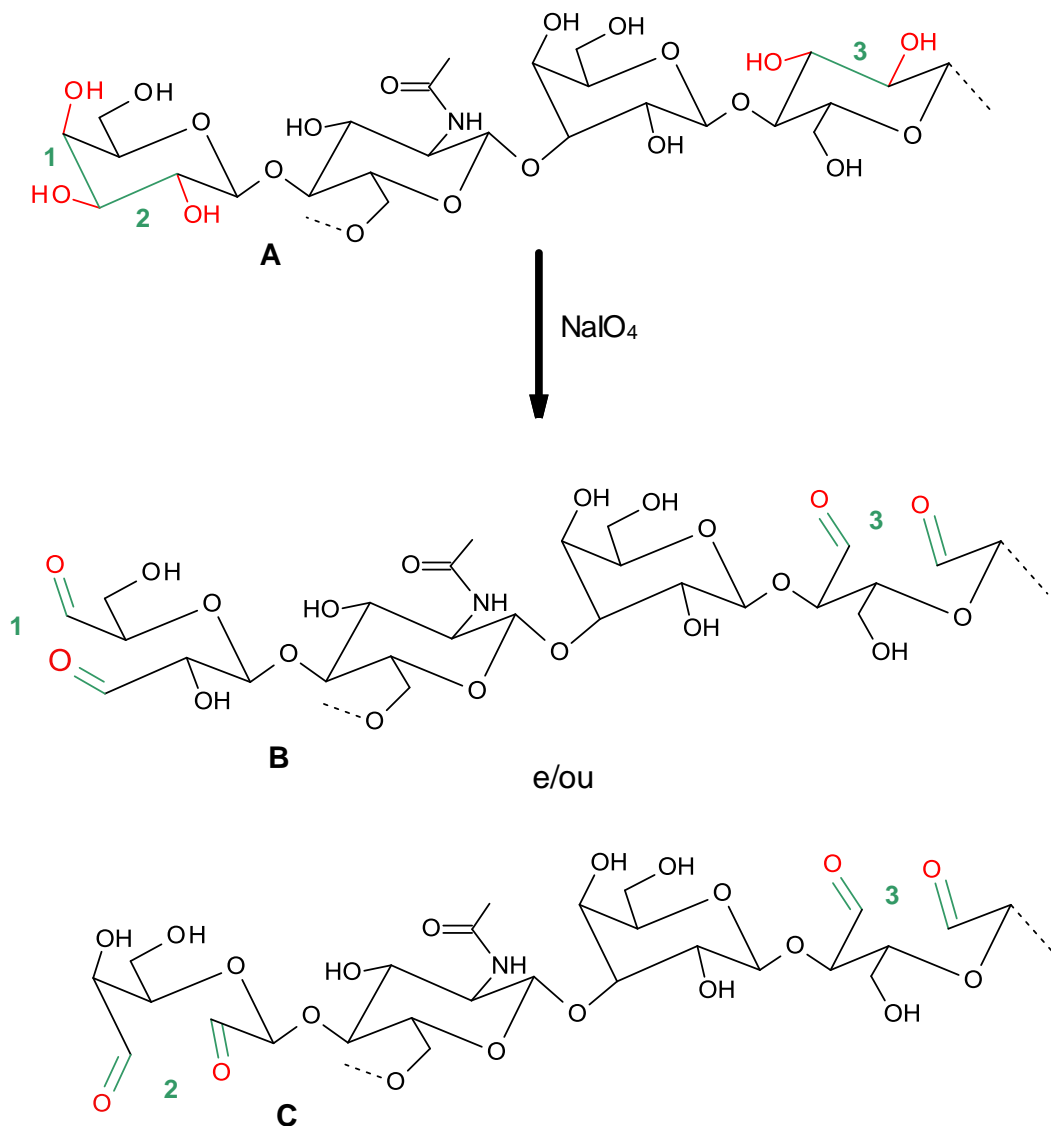
Após o estabelecimento da condição ótima de hidrólise do PS14 foi necessário avaliar se nesta condição também ocorria hidrólise do grupamento amida do açúcar N-acetil-glicosamina com subsequente formação de um grupamento amina.

Desta forma, foi realizada a dosagem de grupos amino pelo Método TNBS (QI; KEYHANI; LEE, 1988), sendo observado que o açúcar N-acetil-glicosamina é preservado durante a reação de hidrólise, o que é importante, já que este resíduo parece estar envolvido na imunogenicidade do PS14 (MAWAS et al., 2002).

5.1.3 Oxidação

Após a reação de hidrólise, o próximo passo foi a oxidação das hidroxilas vicinais do PS14, gerando grupos aldeídicos a fim de tornar o PS reativo para as reações subsequentes. Sendo assim, o PS14 hidrolisado foi oxidado com NaIO_4 por 30 minutos no escuro, onde se observou uma relação molar aldeído/PS em torno 15.

O rendimento médio da reação de oxidação foi de 85%. O **Esquema 10** mostra os locais suscetíveis à oxidação no PS14.

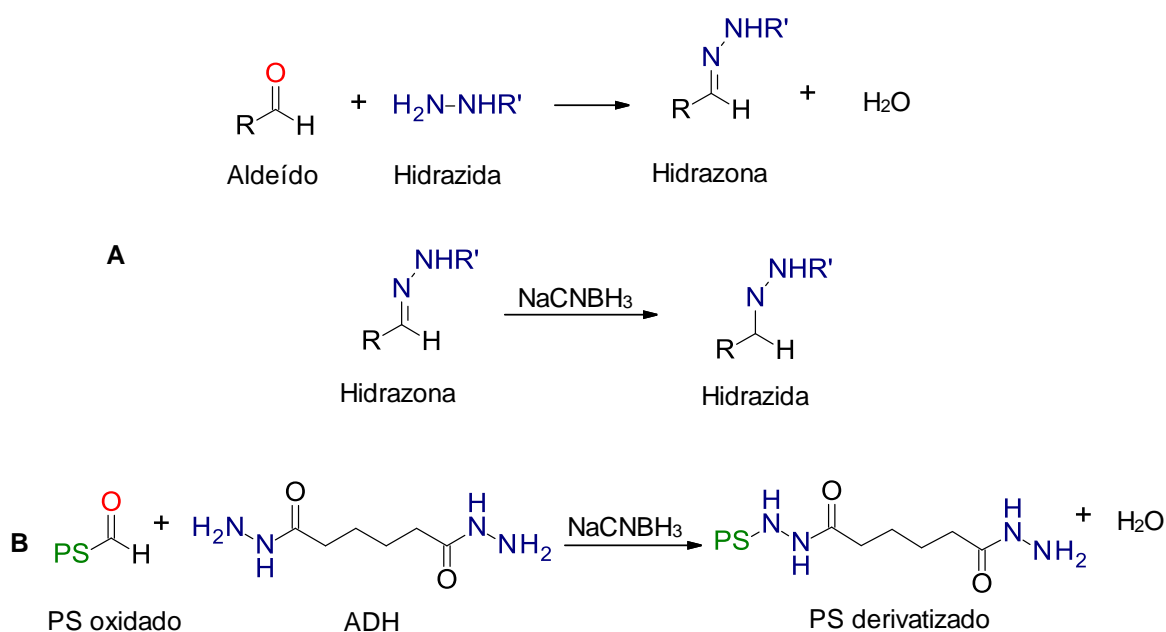


Esquema 10: Esquema Geral de Oxidação do PS14. (A) Subunidade de Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14 e suas hidroxilas vicinais suscetíveis à oxidação por NaIO_4 destacadas em vermelho. A quantia de ligações suscetíveis à promoverem a abertura do anel pela oxidação destas hidroxilas encontram-se enumeradas e destacadas em verde. **(B e C)** Possíveis produtos formados pela oxidação do PS14 com NaIO_4 .

5.1.4 Derivatização

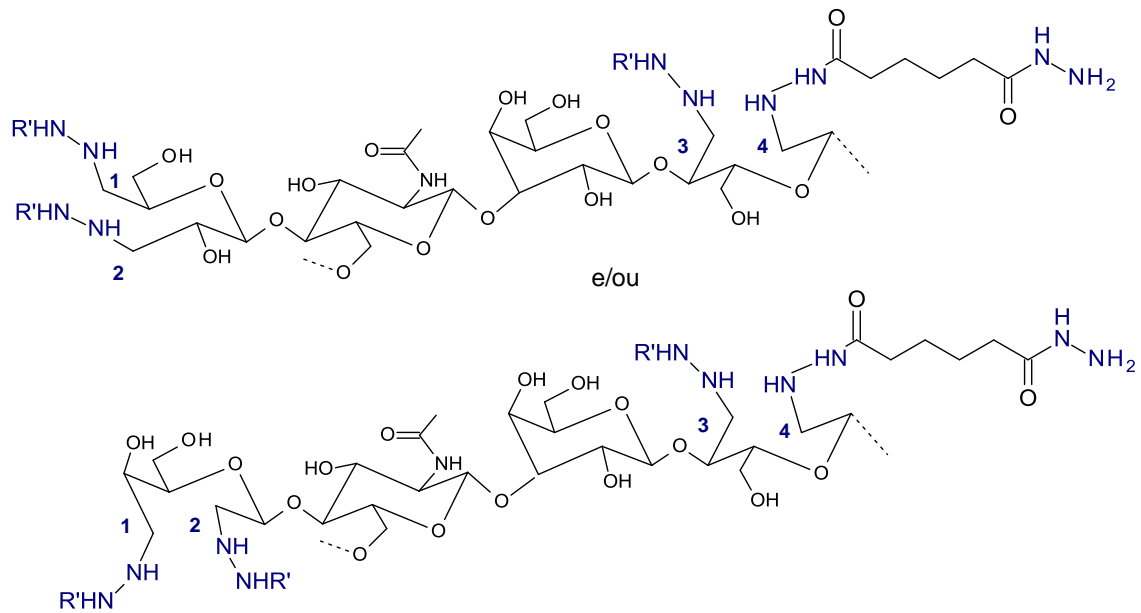
A etapa seguinte foi a reação do aldeído resultante com a diidrazida do ácido adípico (ADH) como molécula espaçadora. Essa reação foi realizada na presença de NaCNBH_3 , cujo resultado foi uma relação molar ADH/PS em torno de 15, onde em termos de subunidade a relação foi de 0,15 mol de subunidade de ADH/mol de subunidade de PS.

O rendimento médio da reação de derivatização foi de 70%. O **Esquema 11** mostra a reação de derivatização com hidrazidas de uma forma geral (A) e com ADH (B), enquanto o **Esquema 12** mostra os locais suscetíveis à derivatização no PS14.



Esquema 11: (A) Esquema Geral da Reação de Derivatização com Hidrazidas. (B) Esquema Geral da Reação de Derivatização do PS oxidado com ADH. A reação ocorre através de um mecanismo de adição nucleofílica, onde o grupamento NH_2 do ADH (nucleófilo) reage com o aldeído do PS formando uma ligação hidrazona, que é posteriormente reduzida pelo NaCNBH_3 resultando no PS derivatizado ou PS-hidrazida (PS-ADH).

Fonte: Adaptado de Morrison e Boyd (2005).



Esquema 12: Subunidade de Polissacarídeo Capsular Sorotipo 14 e grupamentos suscetíveis à derivatização por ADH enumerados e destacados em azul.

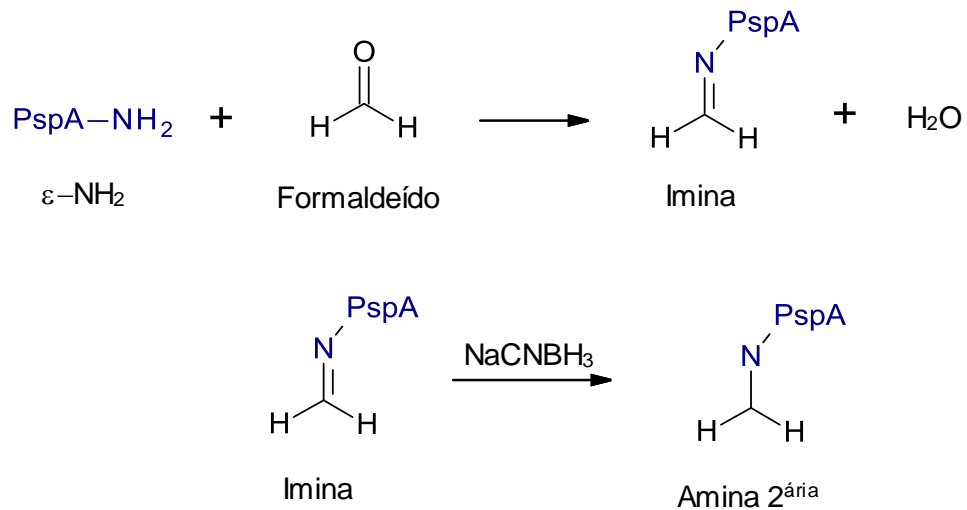
5.2 rPspA3

5.2.1 Modificação da rPspA3 nativa

A rPspA3 nativa foi modificada em seus resíduos de lisina a fim de evitar a polimerização entre moléculas de rPspA3 favorecendo, então, a sua reação com o polissacarídeo. Tal procedimento foi necessário tendo em vista que durante a reação de conjugação havia um alto grau de polimerização com formação de gel, impedindo a formação e/ou purificação do conjugado.

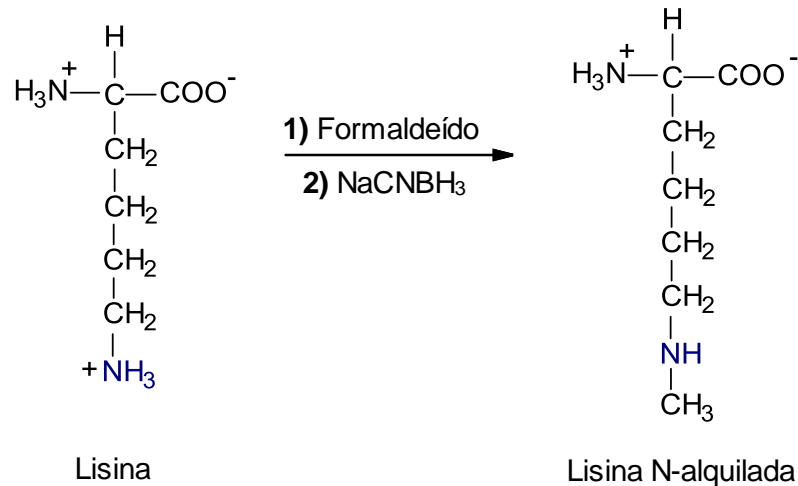
Desta forma, os grupos ϵ -amino dos resíduos de lisina da rPspA3 foram protegidos por N-alquilação com formaldeído através de uma reação de aminação redutiva, onde nas condições empregadas pôde ser observada uma modificação de 70% destes resíduos. O rendimento médio da reação de modificação foi de 90%.

O **Esquema 13** mostra a reação de proteção de grupos ϵ -amino por aminação redutiva com formaldeído e NaCNBH_3 e o **Esquema 14** mostra o resíduo de lisina N-alquilado.



Esquema 13: Esquema Geral da Reação de Proteção dos Grupos ε -amino da rPspA3 por Aminoação Redutiva com formaldeído e NaCNBH₃. A reação ocorre por um mecanismo de adição nucleofílica, onde o grupamento ε -NH₂ da lisina (nucleófilo) reage com o formaldeído formando uma imina, que é posteriormente reduzida pelo NaCNBH₃ resultando na rPspA3mod.

Fonte: Adaptado de Morrison e Boyd (2005).



Esquema 14: Resíduo de Lisina da rPspA3 N-alkilado por Aminoação Redutiva com formaldeído e NaCNBH₃.

A **Figura 13** mostra o perfil da rPspA3 nativa e modificada em gel de poliacrilamida (SDS Page 8%).

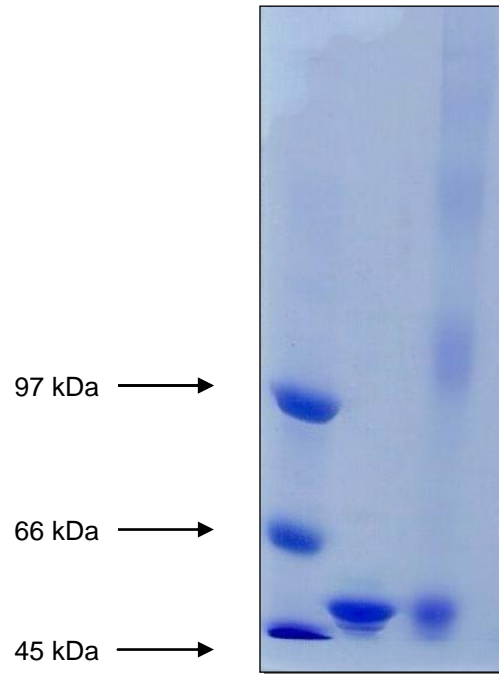
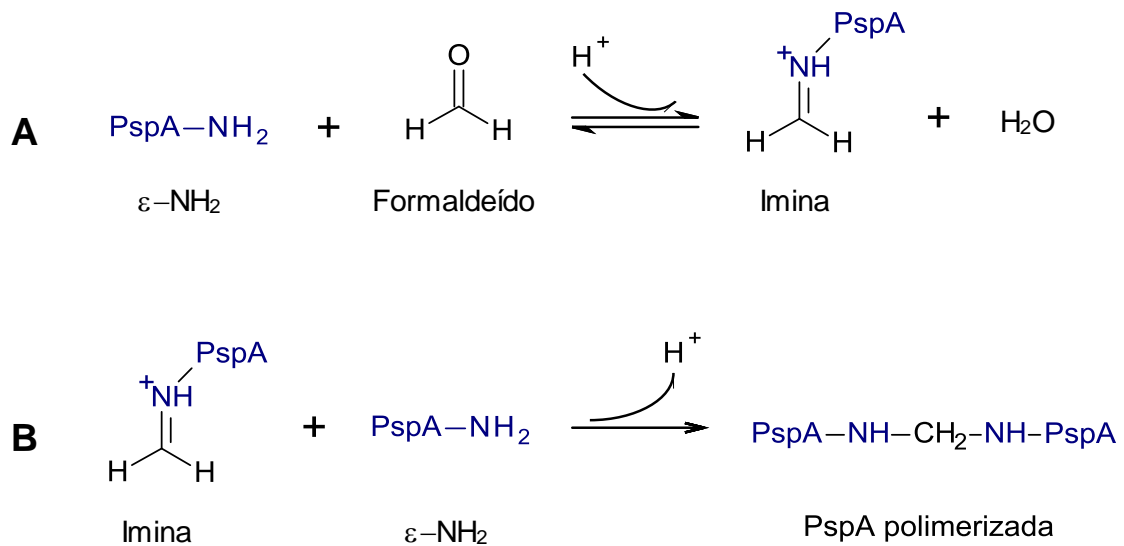


Figura 13: Perfil Eletroforético da rPspA3 nativa e modificada, onde: 1) Padrão de baixo peso molecular (P.M.); 2) rPspA3 nativa; 3) rPspA3 modificada.

O gel acima mostra que os padrões de menor peso molecular (30 kDa; 20,1 kDa e 14,4 kDa) correram para fora do gel devido à baixa concentração da acrilamida.

Também pôde ser observado que durante a reação de modificação da rPspA3 nativa houve um certo grau de polimerização entre moléculas de rPspA3. Tal fato pode ocorrer, pois a rPspA3 ao reagir com o formaldeído leva à formação de um grupamento imina instável que ao invés de ser reduzido por NaCNBH_3 (**Esquema 13**), também pode vir a reagir com o grupo ϵ -amino de outra molécula de rPspA3, sofrendo polimerização (**Esquema 15**).



Esquema 15: Polimerização da rPspA3 nativa na presença de formaldeído.

Fonte: Adaptado de Rappuoli (1997).

A modificação e a polimerização permitiram a obtenção do conjugado e não interferiram na resposta imune para a rPspA3 como mostraremos adiante.

5.3 Conjugação do PS14-ADH com a rPspA3mod

Como citado anteriormente (**seção 1.1.6**), o método de conjugação testado neste trabalho foi o método desenvolvido e otimizado em nosso laboratório para a obtenção do conjugado PS de *H. influenzae* tipo b com o toxóide tetânico, que consiste na oxidação das hidroxilas vicinais do PS para a obtenção de grupos aldeídicos, que são posteriormente reagidos com ADH. Por fim, o PS ativado (PS-hidrazida) reage com a proteína ativada em seu grupamento carboxila pelo ativador DMT-MM, conforme mostrado nos **Esquemas 5 e 7** (BARAZZONE; TANIZAKI, 2009; INSTITUTO BUTANTAN, 2009).

Para detecção e purificação do conjugado PS14-rPspA3, adotou-se a técnica de cromatografia de interação hidrofóbica, onde controles foram feitos através da eluição de amostras de PS14-ADH e rPspA3mod livres (**Figura 14**).

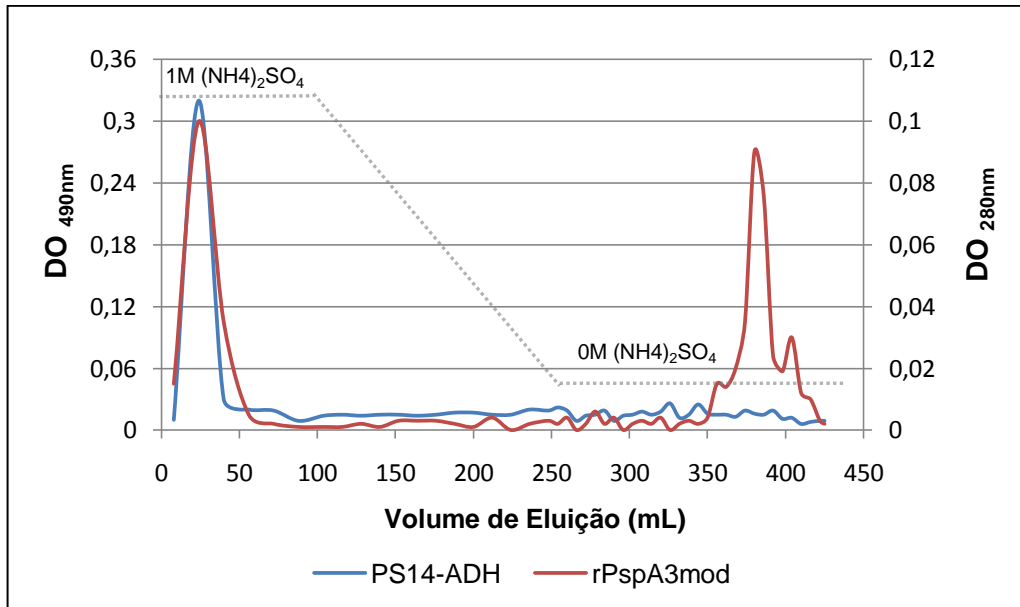


Figura 14: Cromatograma do PS14-ADH e da rPspA3mod livres em Resina Phenyl Sepharose 6FF (High Sub). Eluição em gradiente decrescente de 1M a 0M de (NH₄)₂SO₄. Fluxo: 3mL/min. *Observação:* O PS14-ADH também é lido em densidade óptica de 280nm, não havendo eluição da proteína no início da corrida.

O conjugado obtido neste trabalho apresentou um rendimento médio de reação em torno de 20% e uma relação de aproximadamente 2:1 (rPspA3mod:PS14) em termos de massa, sendo que a razão molar para o mesmo foi de 3:1.

O conjugado foi eficientemente purificado dos componentes PS14-ADH e rPspA3mod que não reagiram. A **Figura 15** mostra a obtenção do conjugado PS14-rPspA3.

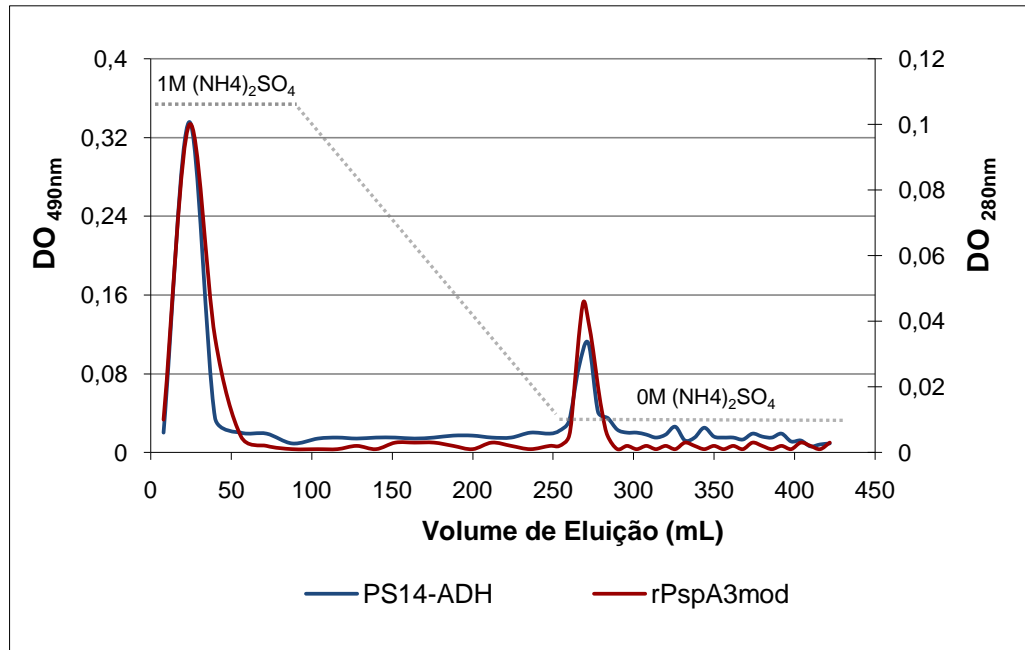


Figura 15: Cromatograma do conjugado PS14-rPspA3 em Resina Phenyl Sepharose 6FF (High Sub). Eluição em gradiente decrescente de 1M a 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Fluxo: 3mL/min. *Observação:* O PS14-ADH também é lido em densidade óptica de 280nm, não havendo eluição da proteína no início da corrida.

Embora o rendimento da reação de conjugação química não tenha sido satisfatório quando comparado ao rendimento obtido para o conjugado PS6B-rPspA3 em nosso laboratório (PERCIANI, C.T.), este ainda se encontra de acordo com os rendimentos mais altos descritos na literatura para obtenção de conjugados em geral, onde geralmente menos de 20% do PS ativado torna-se conjugado (FRASCH, 2009).

Também é importante ressaltar que este foi o maior rendimento obtido em uma condição na qual não havia a formação de gel, o que dificultava a sua purificação, sendo este o fator limitante para a obtenção de maiores rendimentos para este conjugado.

Além disso, na literatura não constam em valores o rendimento para quaisquer conjugados obtidos com o PS14, exceto em um trabalho realizado por um grupo do Uruguai que mostrou rendimentos variando de 2-5% para a conjugação do PS14 com a albumina em todos os métodos de conjugação química testados, sendo eles: Método da Aminoação Redutiva e Método do Brometo de Cianogênio descritos anteriormente (**seção 1.1.6**), assim como uma fusão destes métodos, da mesma forma que o método apresentado neste presente trabalho, porém com a utilização do EDAC ao invés do DMT-MM como agente ativador (MASSALDI, 2000).

Portanto, o fato do rendimento ainda permanecer baixo no presente trabalho não parece ser devido ao método de conjugação química empregado, já que em nosso laboratório este mesmo método possibilitou a obtenção de um conjugado com 60% de rendimento para o PS6B com a rPspA3 modificada e um rendimento de 40% para o PS de *H. influenzae* tipo b com o toxóide tetânico.

Neste contexto, estudos mais aprofundados em relação às propriedades químicas e físico-químicas do PS14 necessitam ser realizados para avaliar se para este sorotipo capsular em particular, tal método ainda seja válido com algumas possíveis alterações a fim de se otimizar o seu rendimento de conjugação ou se para o PS14, o método utilizado realmente limita-se ao rendimento obtido e apresentado neste trabalho. Para tal, testes a fim de se avaliar a interferência do pH e da força iônica do meio na reação de conjugação, através da utilização de outros tampões, estão sendo realizados em nosso laboratório, tendo em vista que nem uma maior redução da massa molar média do polissacarídeo obtido da ATCC (aproximadamente 20 kDa) como uma maior modificação dos resíduos de lisina protéicos (modificação de aproximadamente 90%) foram capazes de impedir a formação de gel.

Estudos a fim de se avaliar quais resíduos dos PSs capsulares dos sorotipos 14 e 6B sofrem oxidação e posterior derivatização no intuito de compará-los também estão em andamento, já que nas mesmas condições reacionais houve uma grande diferença no rendimento de conjugação de ambos. Como pode ser observado na **Figura 16**, a estrutura química destes polissacarídeos é bastante distinta e resultados iniciais mostraram que a oxidação do PS6B ocorre no ribitol (FORNAZARI, M.A.), que se apresenta como uma estrutura de cadeia aberta, enquanto no PS14 a oxidação apenas ocorre em resíduos de cadeia fechada, o que pode facilitar a formação de gel.

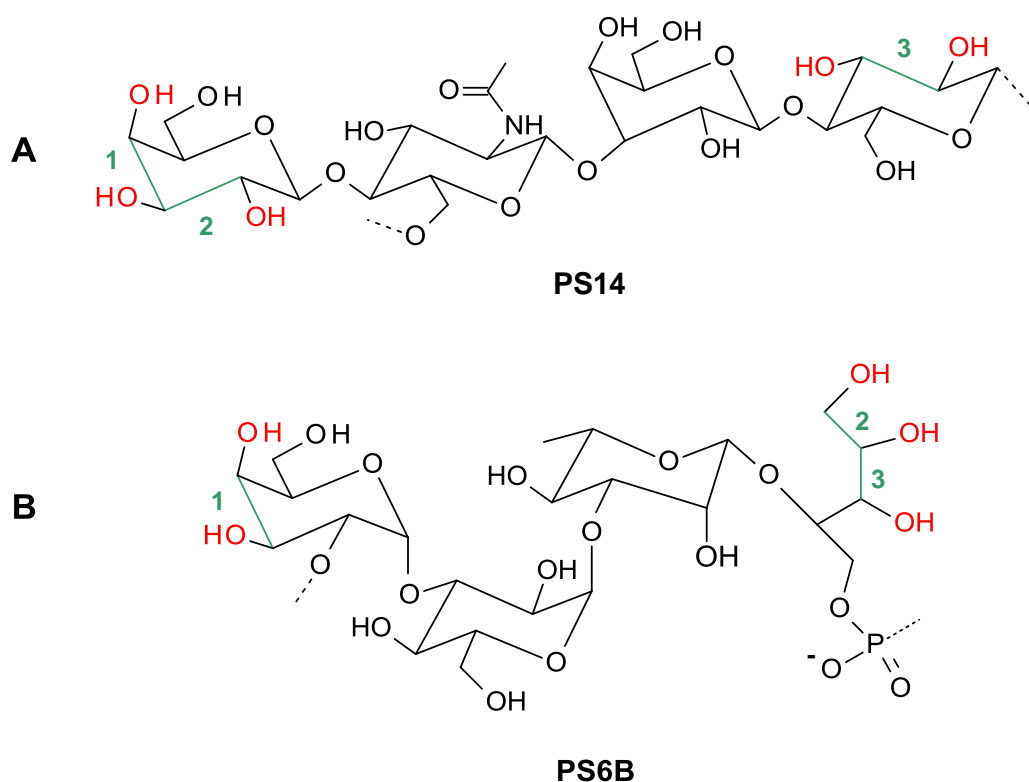


Figura 16: Subunidades dos Polissacarídeos Capsulares Sorotipos 14 e 6B. (A) PS14: β -D-Galp(1-4)- β -D-GlcNAcp(1-3)- β -D-Galp(1-4)- β -D-Glcp(1-6); **(B)** PS6B: α -D-Galp(1-3)- α -D-Glcp(1-3)- α -L-Rhap(1-4)-D-Ribitol-5-PO₄. As hidroxilas vicinais suscetíveis à oxidação por NaIO₄ estão destacadas em vermelho. A quantia de ligações suscetíveis à promoverem a abertura do anel ou a fragmentação do PS pela oxidação destas hidroxilas encontram-se enumeradas e destacadas em verde.
Fonte: Klein e Ellis (1997).

5.4 Avaliação da Resposta Imune Humoral induzida pelo PS14-rPspA3

5.4.1 Avaliação do Título de IgG anti-PS14 e anti-rPspA3

A análise do soro dos camundongos BALB/c imunizados mostrou que o conjugado PS14-rPspA3 é eficiente na indução de IgG anti-PS14 e, inclusive, já se pôde observar uma boa resposta de IgG anti-PS14 após primeira dosagem.

A produção de IgG anti-PS14 pelo conjugado PS14-rPspA3 além de efetiva, também mostrou valores estatisticamente significativos em relação aos controles (PS14 livre e coadministrado) em todas as doses administradas, sendo que após a terceira imunização atingiu-se um valor de $p < 0,0001$. Desta forma, pôde ser evidenciada a transformação deste PS em um antígeno timo-dependente através da

obtenção de um aumento significativo na produção de IgG anti-PS14 após segunda e terceira imunização, o que não ocorre com os grupos controle.

A **Figura 17** mostra o log do título de IgG anti-PS14 no soro de camundongos imunizados com o conjugado PS14-rPspA3 e seus respectivos controles.

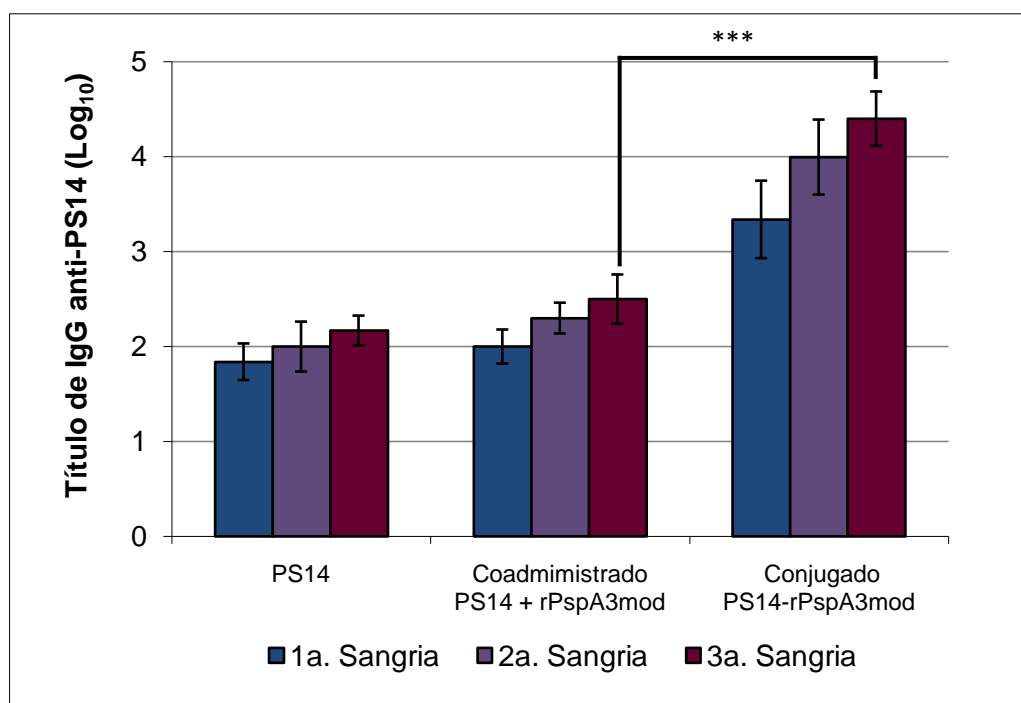


Figura 17: Título de IgG anti-PS14 no soro de camundongos imunizados com o conjugado PS14-rPspA3 e grupos controle. O valor do título referente à salina foi descontado do título dos demais grupos. As barras indicam o desvio padrão da média. Os asteriscos indicam a diferença estatística entre o conjugado e os controles após 3ª dose, onde $***p < 0,0001$. Os resultados são representativos de dois experimentos individuais.

Em relação à produção de IgG anti-rPspA3 foi evidenciado um perfil semelhante após primeira imunização para todos os grupos. Porém, após segunda imunização ocorreu uma menor produção de IgG anti-rPspA3 para o conjugado em relação à rPspA3 livre (nativa ou modificada). No entanto, os títulos de IgG anti-rPspA3 no grupo imunizado com o conjugado ainda permanecem altos e, além disso, outros fatores devem ser analisados, já que como parâmetro único a avaliação dos níveis de IgG formados não é capaz de prever a proteção conferida por estes anticorpos *in vivo*, necessitando da realização de outros ensaios *in vitro* como correlato de proteção (ALONSO DE VELASCO et al., 1995a).

Após terceira dose, não há diferença estatística na produção de IgG anti-rPspA3 para nenhum dos grupos. A **Figura 18** mostra o log do título de IgG anti-

rPspA3 no soro de camundongos imunizados com o conjugado PS14-rPspA3 e seus respectivos grupos controle.

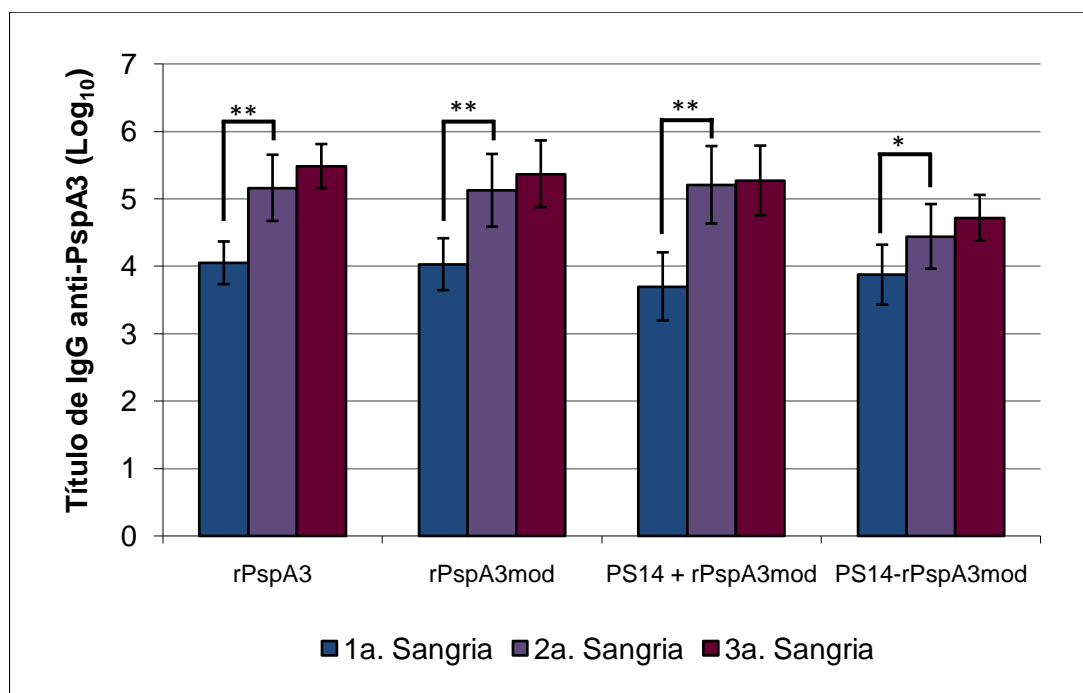


Figura 18: Título de IgG anti-rPspA3 no soro de camundongos imunizados com o conjugado PS14-rPspA3 e grupos controle. O valor do título referente à salina foi descontado do título dos demais grupos. As barras indicam o desvio padrão da média. Os asteriscos indicam a diferença estatística entre as diferentes doses, onde $*p < 0,05$ e $**p < 0,001$. Os resultados são representativos de dois experimentos individuais.

5.4.2 Determinação do Índice de Avidéz

A avidéz consiste na força de interação pela qual o anticorpo se liga ao antígeno, onde anticorpos de alta afinidade são produzidos pelo processo de maturação da afinidade, o qual ocorre nos centros germinativos dos tecidos linfóides através da mutação somática dos genes de Ig, seguida por sobrevivência seletiva de linfócitos B produtores de anticorpos com maior afinidade (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; ANTTILA et al., 1998; PERCIANI et al., 2007).

Até o final da década de 90, muito pouco era sabido em relação à avidéz de anticorpos após a imunização com vacinas anti-pneumocócicas conjugadas.

No entanto, a avidéz de anticorpos passou a ser utilizada como um indicativo da atividade funcional de IgG anti-PS de *H. influenzae* tipo b, onde anticorpos de

maior avidéz mostraram-se superiores aos de baixa avidéz em relação à sua atividade opsonofagocítica e eficácia protetora (USINGER; LUCAS, 1999).

Outro estudo mostrou que a obtenção de conjugados entre o PS9V com a pneumolisina ou autolisina geraram anticorpos de alta avidéz, com maior atividade opsonofagocítica e eficácia protetora contra infecção por pneumococo. Sendo assim, é importante ressaltar que embora avidéz não sirva como indicador universal da eficácia protetora dos anticorpos formados, em cepas patogênicas encapsuladas como o pneumococo, a alta avidéz de anticorpos no soro pode prover uma medida mais específica da proteção contra o patógeno (LEE; WANG; FRASCH, 2001).

Portanto, embora a medida da avidéz não seja capaz de predizer a eficácia protetora, ela fornece dados qualitativos da resposta imune, sendo acreditado que o aumento na avidéz é correlacionado com a indução de memória imunológica de células B. Desta forma, a medida da avidéz torna-se uma ferramenta útil para avaliação do desenvolvimento de memória de imunológica (WHO, 2009b).

Neste trabalho, a avidéz foi expressa de acordo com a porcentagem de anticorpos que permaceram ligados ao antígeno após tratamento com KSCN. Sendo assim, foi observado que o IA de IgG anti-PS14 no conjugado PS14-rPspA3 aumentou de 50% para 80% em relação ao PS14 livre ou coadministrado após terceira imunização, enquanto a avidéz de IgG anti-rPspA3 foi semelhante tanto para o conjugado PS14-rPspA3 como para a rPspA3 livre (nativa ou modificada), apresentando um IA de 60%.

5.4.3 Deposição de Complemento

A habilidade na indução de proteção em modelos animais é o principal critério para seleção de candidatos vacinais para estudo em humanos. No entanto, alguns sorotipos de pneumococo comumente isolados de humanos não são virulentos em camundongos, como é o caso do sorotipo 14. Dessa forma, a utilização de métodos *in vitro* que sejam capazes de predizer a proteção *in vivo*, como por exemplo, medida dos isotipos de IgG formados, determinação do índice de avidéz, ativação do complemento ou opsonofagocitose tornam-se necessários (ALONSO DE VELASCO et al., 1995a; CHIAVOLINI; POZZI; RICCI, 2008).

A proteção contra patógenos geralmente depende de diversos parâmetros e não pode ser correlacionada com apenas um ensaio *in vitro*.

Desta forma, a funcionalidade de IgG anti-PS14 também foi analisada através da deposição de complemento mediada por estes anticorpos através da via clássica de ativação, já que a defesa do hospedeiro contra infecção por pneumococo depende principalmente da opsonização da bactéria por anticorpos sorotipo-específicos na presença de complemento, seguida de fagocitose por neutrófilos e macrófagos e subsequente eliminação. Sendo assim, a fagocitose mediada pelo sistema complemento por IgG anti-PS confere proteção contra doença pneumocócica. Portanto, o desenvolvimento de vacinas anti-pneumocócicas tem focado na indução destes anticorpos (LEE; WANG; FRASCH, 2001).

A **Figura 19** mostra o aumento da deposição de complemento pela via clássica de ativação na presença do soro anti-PS14 produzido pelos camundongos imunizados com o conjugado em relação aos imunizados com os controles em duas cepas distintas (St245/00 e P630) expressando PS14 e PspA1.

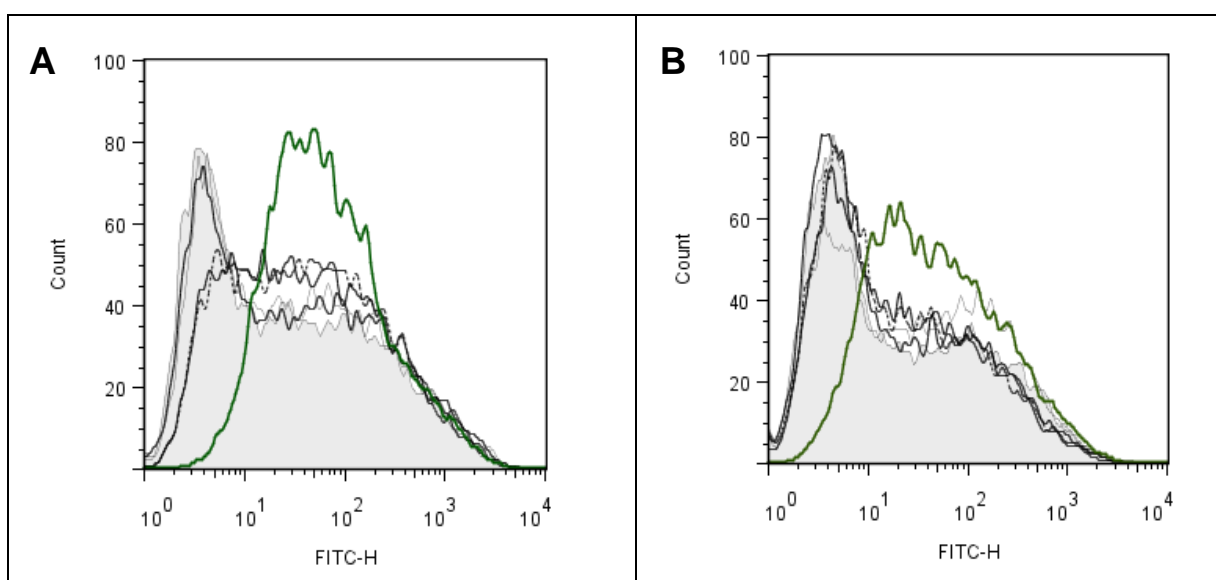


Figura 19: Deposição de C3 na superfície de *Streptococcus pneumoniae* na presença de soro anti-PS14. (A) Cepa St245/00 e Valores das medianas obtidas para os diferentes grupos: Salina (Área cinza): 24,32; rPspA3 (Linha Sólida): 24,99; rPspA3mod (Linha Tracejada Longa): 24,5; PS14 (Linha Tracejada Simples): 35,71; PS14 + rPspA3mod (Linha Pontilhada): 38,33; PS14-rPspA3 (Linha Verde): 56,13. **(B)** Cepa P630 e Valores das medianas obtidas para os diferentes grupos: Salina (Área cinza): 12,03; rPspA3 (Linha Sólida): 11; rPspA3mod (Linha Tracejada Longa): 10,19; PS14 (Linha Tracejada Simples): 15,18; PS14 + rPspA3mod (Linha Pontilhada): 12,59; PS14-rPspA3 (Linha Verde): 40,55.

Os diferentes sorotipos de polissacarídeo capsular de pneumococo variam na ativação e deposição de complemento, assim como na resistência à fagocitose.

Um estudo anterior demonstrou que o pneumococo sorotipo 14 é capaz de depositar complemento através da via alternativa de ativação (FINE, 1975). Desta forma, os resultados de deposição foram expressos em mediana devido ao fato do pneumococo sorotipo 14 depositar complemento independentemente da presença de IgG, o que dificultou a análise de deposição através da porcentagem de células fluorescentes, sendo este valor semelhante para todos os grupos. No entanto, ao se avaliar a mediana referente à intensidade de fluorescência destas células em função da deposição de complemento obtida para os diferentes grupos, foi observada maior deposição de complemento nas células do pneumococo incubadas com o soro de camundongos imunizados com o conjugado, confirmando o aumento da deposição de complemento pela via clássica de ativação na presença de IgG anti-PS14 em ambas as cepas expressando PS14.

Da mesma forma, também foi avaliada a capacidade da deposição de complemento pelos anticorpos IgG anti-rPspA3 na superfície do pneumococo expressando PspA3, sendo observado que a deposição na bactéria incubada com o soro de camundongos imunizados com o conjugado foi maior em relação à deposição na presença do soro de camundongos imunizados com a rPspA3 livre (nativa ou modificada) ou coadministrada.

A **Figura 20** mostra o aumento da deposição de complemento na presença do soro anti-rPspA3 conjugada em relação aos controles na cepa P275/97 expressando PS3 e PspA3.

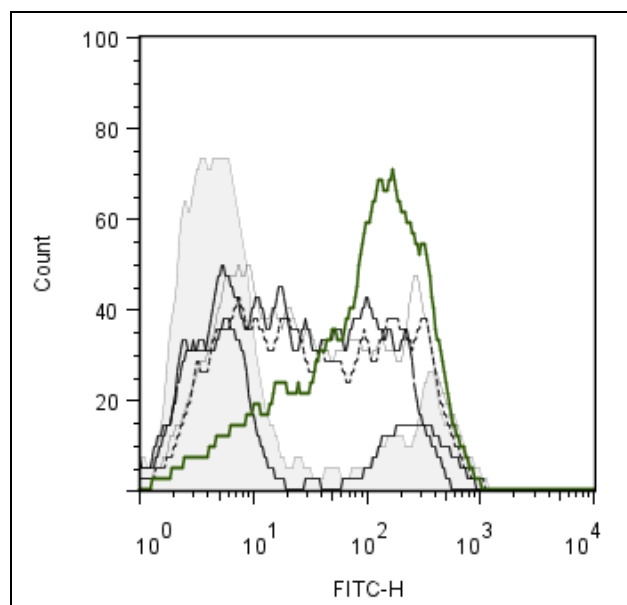


Figura 20: Deposição de C3 na superfície de *Streptococcus pneumoniae* na presença de soro anti-rPspA3. Valores das medianas obtidas para os diferentes grupos: *Salina* (Área cinza): 5,5; *rPspA3* (Linha Sólida): 28,75; *rPspA3mod* (Linha Tracejada Longa): 20,59; *PS14* (Linha Tracejada Simples): 6,52; *PS14 + rPspA3mod* (Linha Pontilhada): 31,53; *PS14-rPspA3* (Linha Verde): 106,69.

Este resultado sugere que o processo de conjugação química pode ter resultado em um diferente perfil de distribuição das subclasses de IgG anti-rPspA3, onde ao se conjugar a rPspA3 seriam induzidas subclasses de IgG com maior afinidade por C1q.

5.4.4 Isotipagem de Anticorpos anti-PS14 e anti-rPspA3

As subclasses de IgG estão envolvidas na opsonização, fixação de complemento e fixação à macrófagos (BUCKLEY, 1998; SAELAND et al., 2003).

Os anticorpos IgG em humanos e modelos murinos apresentam funções semelhantes. No entanto, possuem nomenclatura distinta (SAELAND et al., 2003).

As subclasses de IgG humana são representadas por IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, enquanto modelos murinos apresentam as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (SAELAND et al., 2003).

A síntese das diferentes subclasses de IgG humana se inicia no feto a partir da décima primeira semana de gestação, onde a partir das primeiras semanas de vida já é iniciada a produção de IgG1 e IgG3. A partir do terceiro mês de vida, ocorre um aumento contínuo nos níveis destas subclasses, atingindo dois terços dos níveis de adultos no final do segundo ano de vida e níveis equivalentes aos de adultos

entre os 2-3 anos de idade (PASTORINO; JACOB; GRUMACH, 1994; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; FARO; FERNÁNDEZ, 2008).

Em contraste, os níveis de IgG2 e IgG4 aumentam de forma mais lenta. A síntese de quantidades adequadas de IgG2 só ocorre após o segundo ano de vida, atingindo valores de adultos apenas na faixa dos 8-10 anos de idade. Já a concentração de IgG4 é muito baixa na infância, só atingindo valores de adultos na adolescência (PASTORINO; JACOB; GRUMACH, 1994; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; FARO; FERNÁNDEZ, 2008).

As subclasses de IgG diferem entre si por suas propriedades físico-químicas e biológicas, sendo que seus níveis no indivíduo adulto normal distribuem-se de acordo com a **Tabela 3** (BUCKLEY, 1998; PASTORINO; JACOB; GRUMACH, 1994).

Tabela 3 – Propriedades e Distribuição das Subclasses de IgG em adultos.

Propriedades	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Porcentagem de IgG total	60%	25%	10%	5%
Meia-vida no Soro (dias)	23	23	9	23
Fixação de Complemento	++	+	++	-
Ligação à Receptores Fc de Macrófagos (Opsonização)	++	+	++	+
Resposta Contra Antígenos Protéicos	++	+	++	+
Resposta Contra Antígenos Polissacarídicos	+	++	+	+

Fonte: Adaptado de Buckley (1998).

Portanto, IgG1 e IgG3 humana e IgG2a e IgG2b murina apresentam propriedades semelhantes na fixação de complemento e ligação à antígenos protéicos. IgG4 humana e IgG1 murina são consideradas similares na sua propriedade de se ligarem à mastócitos. IgG2 humana e IgG3 murina reconhecem antígenos polissacarídicos (HUSSAIN et al., 1995).

Em relação à capacidade de fixar complemento pela via clássica, há uma ordem de classificação da afinidade das diferentes subclasses de IgG humana para C1q, onde IgG1>IgG3>IgG2. IgG4 não fixa C1q e, portanto, não deposita complemento (BUCKLEY, 1998; FERRANTE et al., 1990; PASTORINO; JACOB;

GRUMACH, 1994; SAELAND et al., 2003). Neste contexto, para o modelo murino tal afinidade seria: IgG2a>IgG2b>IgG3, onde IgG1 não fixaria C1q.

De acordo com Mawas, Feaver e Corbel (2000) IgG1 não fixa complemento de forma eficiente, acreditando que a sua contribuição na proteção contra infecção pneumocócica seja através da sua ligação à receptores Fc ou na prevenção da colonização em superfícies mucosas.

No entanto, de acordo com Alonso DeVelasco et al. (1995b) (**Tabela 4**), a IgG1 murina, assim como IgG2a e IgG2b, também se assemelha à IgG1 e IgG3 humana, atuando na resposta contra antígenos T-dependentes. Portanto, em camundongos, a distribuição das subclasses de IgG em resposta à antígenos protéicos ocorre da seguinte forma: IgG1>IgG2a>IgG2b>IgM>IgG3. Briles et al. (1981) também afirmaram que a subclasse IgG1 é predominante em resposta contra antígenos protéicos tanto em humanos como em camundongos.

Tabela 4 – Características gerais da resposta imune contra diferentes antígenos.

Característica	Antígenos TD	Antígenos TI-2	Conjugados PS-Prot
Requerimento de célula T	Sim	Não	Sim
Indução de Memória	Sim	Não	Sim
Resposta em Infantes	Sim	Não	Sim
Principais Subclasses de IgG humana	IgG1 > IgG3	IgM > IgA > IgG2	IgG2 > IgG1
Principais Subclasses de IgG murina	IgG1 > IgG2a	IgM > IgG3 > IgG1	IgG1 > IgG3 > IgM

Fonte: Adaptado de Alonso DeVelasco et al. (1995b).

Durante o processo infeccioso ou após a imunização, a persistência e o pico das concentrações de IgG variam, ou seja, o estímulo antigênico acarreta uma resposta imunológica com a produção de todas as subclasses de IgG, porém ocorrem aumentos significativos em apenas uma ou duas subclasses. As conseqüências desta restrição na produção das subclasses de IgG e a diferença funcional entre elas apresentam um papel importante na defesa do hospedeiro, assim como no processo imunopatogênico da doença (FERRANTE et al., 1990; PASTORINO; JACOB; GRUMACH, 1994).

As subclasses IgG1 e IgG3 humanas são as predominantes na resposta determinada por antígenos protéicos, enquanto a subclasse IgG2 humana

predomina na resposta contra antígenos polissacarídicos (**ver Tabelas 3 e 4**) (ALONSO DE VELASCO et al., 1995b; BUCKLEY, 1998; FERRANTE et al., 1990; PASTORINO; JACOB; GRUMACH, 1994; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; FARO; FERNÁNDEZ, 2008).

Desta forma, a alta suscetibilidade de crianças à infecções recorrentes por bactérias encapsuladas deve-se ao fato da imaturidade de seu sistema imunológico em montar uma resposta imune humoral efetiva contra polissacarídeos (BUCKLEY, 1998; PASTORINO; JACOB; GRUMACH, 1994; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; FARO; FERNÁNDEZ, 2008).

Crianças abaixo de 2 anos também apresentam baixa ou ausente expressão do receptor do complemento CR2/CD21 em células B da zona marginal. Sendo assim, a ausência de resposta para polissacarídeos em crianças abaixo de 2 anos deve-se à uma combinação de diversos fatores como baixos níveis de IgG2 e imaturidade esplênica para receptores de C3d (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; FARO; FERNÁNDEZ, 2008).

Em resumo, a subclasse IgG2a é particularmente importante em modelos murinos, sendo esta a principal subclasse na deposição de complemento, seguida de IgG2b, enquanto a subclasse IgG3 tem sido relatada como protetora contra infecção pneumocócica, possivelmente devido à citotoxicidade celular dependente de anticorpo (BRILES et al., 1981; MAWAS; FEAVERS; CORBEL, 2000; MCLAY et al., 2002).

5.4.4.1 Análise das Subclasses de IgG anti-PS14

A defesa contra infecção pneumocócica é amplamente dependente da opsonização da bactéria por anticorpos sorotipo-específicos e complemento, seguida de fagocitose por macrófagos e neutrófilos. Desta forma, a eficácia da vacina não é dependente apenas da indução de altos níveis de anticorpos, mas também da habilidade destes anticorpos mediarem proteção.

Quando um indivíduo imunocompetente é infectado por *S. pneumoniae*, uma resposta imune contra os seus diferentes antígenos é iniciada (**ver Tabela 4**) (ALONSO DE VELASCO et al., 1995b).

Polissacarídeos bacterianos são antígenos T-independentes do tipo 2 (TI-2), que produzem restritamente anticorpos dos isótipos IgM e IgG2 em humanos e IgM

e IgG3 em camundongos. No entanto, a subclasse de IgG dominante na resposta contra o PS livre troca quando ele é conjugado à uma proteína, tanto em camundongos como em humanos. Em camundongos essa troca de subclasse é de IgG3 para IgG1 (MCLAY et al., 2002; SOININEN et al., 1998).

Portanto, os polissacarídeos na sua forma livre são capazes de induzir resposta em camundongos atímicos, sendo fracamente imunogênicos em crianças de até 24 meses ao passo que ao serem conjugados tornam-se imunogênicos em lactentes e induzem memória imunológica (ALONSO DE VELASCO et al., 1995b; KHAN; LEES; SNAPPER, 2004). Sendo assim, a avaliação da dependência de célula T em vacinas conjugadas através da medida das subclasses de IgG se torna importante, pois ela prediz a atividade funcional dos anticorpos contra o polissacarídeo.

No presente trabalho a imunização de camundongos com PS14 livre resultou na indução de 1,13% de IgG1; 18% de IgG2a; 8,67% de IgG2b e 72,3% de IgG3, enquanto o perfil da distribuição das subclasses induzidas pela imunização do PS14 conjugado à rPspA3 modificada foi de 82% de IgG1; 8,13% de IgG2a; 3,27% de IgG2b e 6,45% de IgG3, conforme mostrado na **Figura 21**.

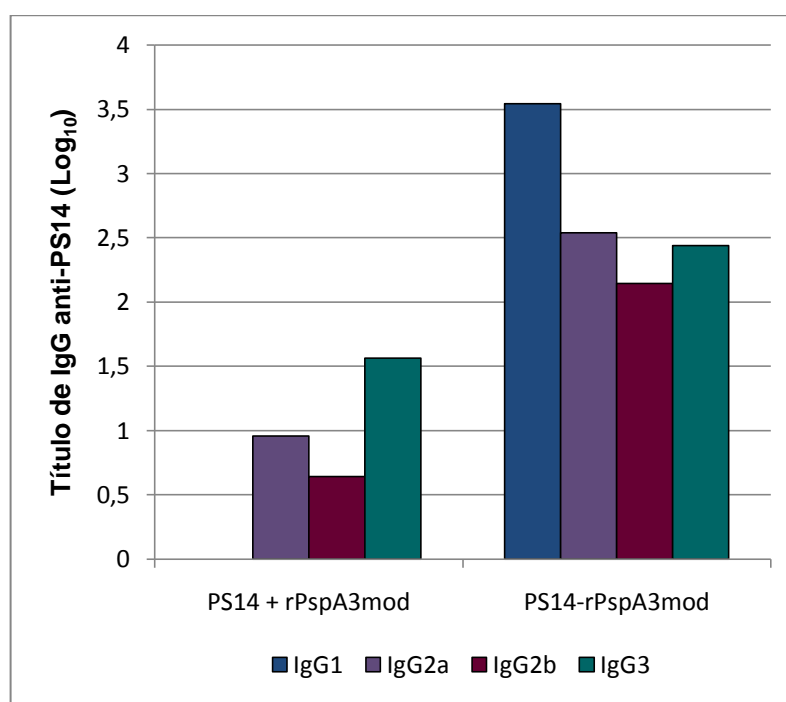


Figura 21: Perfil das Subclasses de IgG induzidas pelo PS14 livre e conjugado à rPspA3.

Tais achados confirmam que o perfil das subclasses de IgG anti-PS induzidas pelo conjugado PS14-rPspA3 está de acordo com o descrito na literatura para outros conjugados, havendo a troca de subclasse de IgG3 para IgG1 ao se conjugar o PS.

Estudos realizados por diversos autores, entre eles Briles et al. (1981) e Mclay et al. (2002) demonstraram a importância de IgG3 anti-PS na proteção contra *S. pneumoniae*, através da imunização passiva de camundongos com IgG3, assim como da utilização de camundongos deficientes em IgG3, respectivamente.

Mclay et al. (2002) demonstraram que camundongos incapazes de produzir IgG3 em resposta contra polissacarídeos são mais suscetíveis à sepse fatal por *S. pneumoniae* do que camundongos produtores de IgG3. Não obstante, também foi demonstrado pelo autor que de maneira semelhante, IgG1 anti-PS induzida por polissacarídeos conjugados a proteínas protegem adequadamente contra sepse por *S. pneumoniae*, concluindo que o alto título de IgG1 anti-PS, restaura a atividade opsonica do soro, protegendo os camundongos após desafio contra *S. pneumoniae*. Este modelo sugeriu que as subclasses de IgG anti-PS são importantes na imunidade contra bactérias encapsuladas.

Desta forma, a partir do perfil de distribuição das subclasses de IgG anti-PS14 induzidas pelo conjugado PS14-rPspA3, assim como a significativa produção de IgG total, a maior avidéz e deposição de complemento apresentada por estes anticorpos, acredita-se que o conjugado obtido seja capaz de conferir proteção *in vivo*, sendo novamente evidenciada a efetividade do método de conjugação química empregado para a obtenção do antígeno vacinal em questão.

5.4.4.2 Análise das Subclasses de IgG anti-rPspA3

A resposta imune contra antígenos proteicos requer a cooperação de linfócitos T e B, como demonstrado pela ausência da formação de anticorpos anti-proteína em camundongos atímicos (ALONSODEVELASCO et al., 1995b; KHAN; LEES; SNAPPER, 2004). Portanto, antígenos proteicos são descritos como timo-dependente (TD), ou seja, para ativação e diferenciação de células B específicas contra este tipo de antígeno para células de memória ou plasmócitos, a ligação do antígeno aos seus receptores não é suficiente, sendo necessária a interação entre as células B e T auxiliares (Th) (ALONSO DE VELASCO et al., 1995b).

Da mesma forma que a subclasse IgG3 é predominante na resposta contra polissacarídeos livre, a subclasse IgG1 é predominante em resposta contra antígenos protéicos tanto em humanos como em camundongos (BRILES et al., 1981).

Os soros dos camundongos imunizados com rPspA3 livre ou conjugada foram isotipados a fim de se avaliar as subclasses de IgG induzidas, para analisar se o seu perfil de distribuição estaria relacionado com o aumento da deposição de complemento observado na superfície do pneumococo incubado com o soro dos camundongos imunizados com a rPspA3 conjugada.

No presente trabalho a imunização de camundongos com rPspA3 livre resultou na indução de 89,4% de IgG1, 5,23% de IgG2a, 2% de IgG2b e 3,35% de IgG3, enquanto o perfil na distribuição das subclasses induzidas pela imunização da rPspA3 conjugada ao PS14 foi de 84,3% de IgG1, 6,73% de IgG2a, 2,34% de IgG2b e 6,65% de IgG3, conforme observado na **Figura 22**.

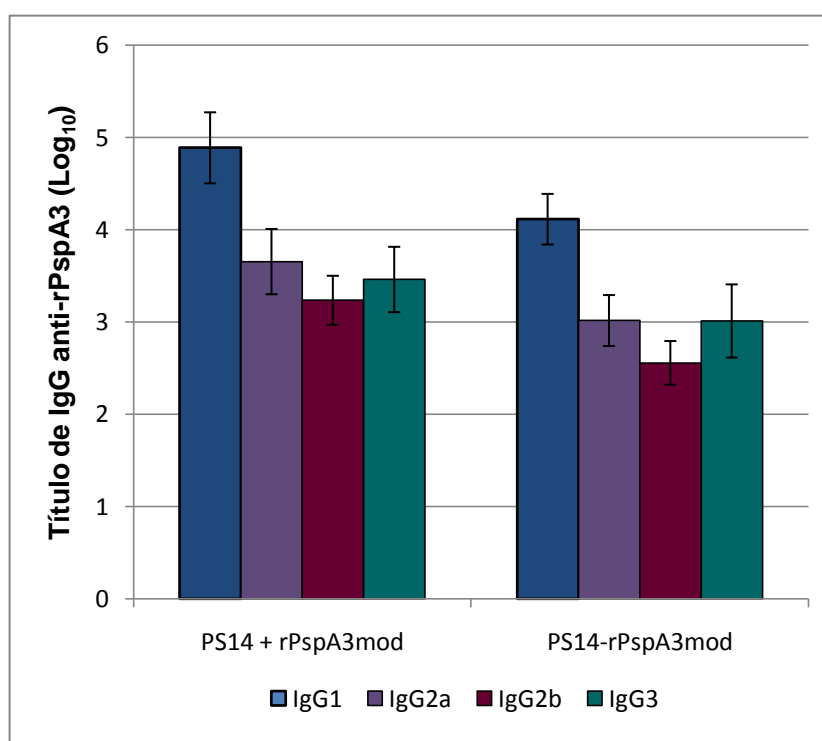


Figura 22: Perfil das Subclasses de IgG induzidas pela rPspA3 livre e conjugada ao PS14. As barras indicam o desvio padrão da média.

A troca do isótipo IgM para as diferentes subclasses do isótipo IgG é dependente de diferentes citocinas, onde INF- γ produzido por células Th1 induz IgG2a, enquanto Il-4 produzida por células Th2 induz IgG1 (HUSSAIN et al., 1995).

De acordo com a **Figura 22** pode ser observada uma similaridade no perfil Th1/Th2 de resposta tanto para a rPspA3 livre como conjugada, resultando na indução de um mesmo perfil de subclasses de IgG anti-rPspA3.

Recentemente, foi relatado que a indução balanceada de IgG1 e IgG2a anti-PspA pode ser correlacionada com maior proteção contra infecções pneumocócicas sistêmicas (FERREIRA et al., 2008), onde de acordo com esta resposta de subclasse de IgG, pode-se antecipar que a indução de uma resposta balanceada de citocinas do tipo Th1 e Th2 pode ser uma resposta ideal para a proteção do hospedeiro (FUKUYAMA et al., 2010).

No entanto, estudos utilizando adjuvantes com maior indução de IgG1 anti-PspA também sugerem que esta subclasse é suficiente para assegurar uma proteção adequada na ausência de respostas de citocinas do tipo Th1 (YAMAMOTO et al., 1998¹ apud FUKUYAMA et al., 2010).

Em resumo, pode se afirmar que o perfil das subclasses de IgG induzido tanto pela rPspA3 livre como conjugada foi o mesmo, evidenciando uma maior produção de IgG1 para ambas. O fato deste perfil não estar relacionado com o aumento na deposição de complemento observado na superfície do pneumococo na presença do soro anti-rPspA3 conjugada, assim como os demais resultados obtidos, sugerem que tanto a rPspA3 livre como conjugada sejam igualmente capazes de assegurar proteção. De maneira semelhante, Csordas et al. (2008) observaram uma maior deposição de complemento induzida por anticorpos anti-rPspA1 conjugada ao PS23F, onde o perfil das subclasses de IgG induzidas e a afinidade destes anticorpos também foram iguais em relação ao observado para a rPspA1 livre. Não obstante, este aumento na deposição de complemento induzido pela rPspA1 conjugada foi correlacionado com maior proteção contra desafio intraperitoneal utilizando uma cepa expressando PS6B e PspA1.

¹ YAMAMOTO, M. et al. A nontoxic adjuvant for mucosal immunity to pneumococcal surface protein A. *J. Immunol.*, v. 161, p. 4115–4121, 1998.

5.4.5 Opsonofagocitose

5.4.5.1 *Análise da Medida da Atividade Funcional de IgG anti-rPspA3*

A determinação de uma resposta humoral adequada após imunização com vacinas conjugadas tem sido relacionada a parâmetros que indicam o nível de proteção conferido pelos anticorpos induzidos por estas vacinas em comparação com as vacinas já licenciadas. Para patógenos extracelulares, tais como *S. pneumoniae*, a fagocitose é um importante mecanismo imunológico para o controle da infecção e, como citado anteriormente (**seção 1.1.4**), a fagocitose eficiente do pneumococo mostrou-se dependente tanto de anticorpos específicos como de complemento (GORDON et al., 2000; MATTHAY et al., 1981; YUSTE et al. 2008).

Desta forma, a detecção de anticorpos opsonofagocíticos é considerada como a técnica adequada para a medida da eficácia protetora de uma vacina conjugada contra DPI, já que o mecanismo primário contra a DPI é mediado por anticorpos opsonofagocíticos e, portanto, a medida destes anticorpos reflete a proteção. Tanto a vacina composta por polissacarídeos capsulares livres como a vacina conjugada induzem anticorpos sorotipo-específicos com atividade opsonofagocítica (WHO, 2005).

Portanto, o ensaio de opsonofagocitose tem sido utilizado como correlato da proteção de anticorpos contra a cápsula, onde baseado em estudos clínicos em infantes, um título opsônico mínimo de 1:8 foi correlacionado com a eficácia protetora contra DPI para todos os sorotipos capsulares após 3 doses da vacina conjugada, ou seja, 1:8 representa o título com boa atividade opsonofagocítica contra polissacarídeos pneumocócicos e corresponde à uma concentração de anticorpos de 0,2-0,35µg/mL (HENCKAERTS et al., 2007; JÓDAR et al., 2003).

No entanto, até o presente momento a opsonofagocitose não tem sido estabelecida como correlato da proteção conferida por anticorpos contra proteínas pneumocócicas, inclusive por anticorpos anti-PspA. Porém, acredita-se que o ensaio de opsonofagocitose pode fornecer tal informação a respeito dos anticorpos anti-PspA, já que o mecanismo de ação principal da PspA é interferir na opsonização mediada pelo componente C3 do complemento na superfície do pneumococo, impedindo a opsonofagocitose e o “clearance” do microrganismo na corrente sangüínea, onde estudos demonstraram que a habilidade dos anticorpos anti-PspA

de induzirem a deposição de complemento na superfície do pneumococo contribuem para o seu efeito protetor, pois mascaram epítopos responsáveis por esta função (CSORDAS et al., 2008; REN et al., 2004).

Portanto, para avaliar a correlação do aumento da deposição de complemento com a proteção conferida pelos anticorpos anti-rPspA3 conjugada, nós avaliamos a habilidade dos soros anti-rPspA3 livre e conjugada na promoção da opsonofagocitose utilizando macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c estimulados com ConA, uma lectina vegetal ativadora de célula T, que induz a produção de INF- γ , aumentando a atividade fagocítica destes macrófagos.

Sendo assim, foi observado que a atividade opsonofagocítica dos anticorpos anti-rPspA3 foi similar para o soro anti-rPspA3 livre e o soro anti-rPspA3 conjugada na superfície da cepa P679/99 expressando PS6B e PspA3, onde ambos atingiram um valor de $p < 0,001$ (**Figura 23**).

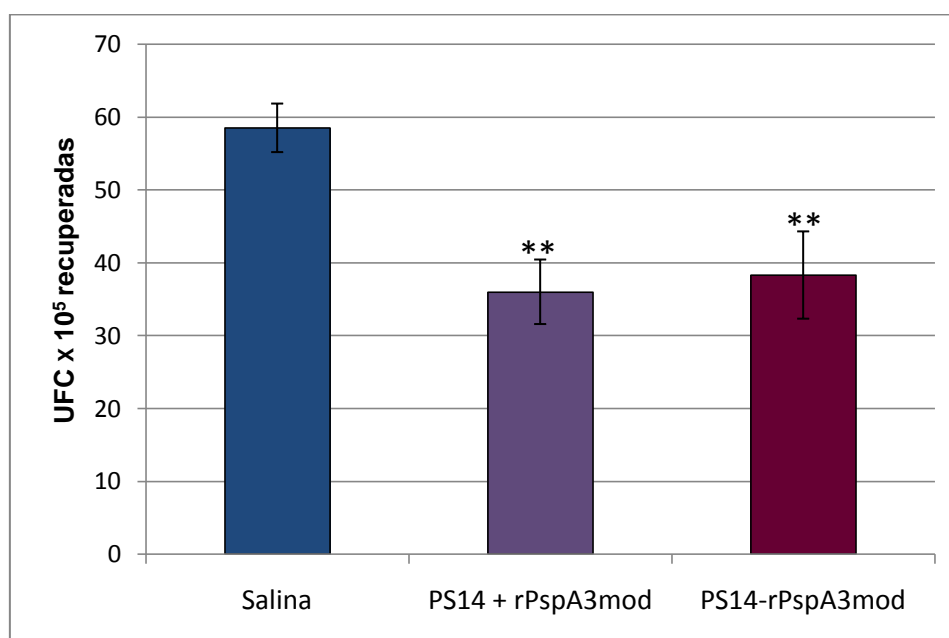


Figura 23: Ensaio opsonofagocítico na presença de soro anti-rPspA3 livre e conjugada. O ensaio foi realizado com a cepa P679/99 (PS6B/PspA3). As barras indicam o desvio padrão da média. Os asteriscos indicam a diferença estatística entre os grupos e a salina, onde $**p < 0,001$.

Também pode ser observado que ambos os soros foram capazes de induzir a opsonofagocitose, reduzindo a recuperação de UFC em aproximadamente 40%, sugerindo eficácia protetora semelhante para os anticorpos anti-rPspA3 induzidos tanto pelos animais imunizados com a rPspA3 livre como conjugada.

Portanto, embora o processo de conjugação tenha aumentado a habilidade dos anticorpos anti-rPspA3 de se ligar à superfície do pneumococo, este aumento não foi suficiente para bloquear os epitopos responsáveis pela interação da PspA com o complemento, resultando em melhor opsonização e maior “*clearance*” em relação aos anticorpos anti-rPspA3 livre.

Este resultado está em concordância com trabalhos anteriores que mostraram que nem sempre o aumento no perfil de deposição de complemento está relacionado com o aumento da opsonofagocitose (BROUWER et al., 2008; YUSTE et al., 2008).

Desta forma, infere-se que a atividade funcional da rPspA3 não foi alterada pelo processo de conjugação, evidenciando novamente a eficácia do método de conjugação empregado do ponto de vista imunológico.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho aborda um novo método de conjugação química para obtenção de vacinas conjugadas, onde a modificação da rPspA3 nativa constituiu um passo essencial para obtenção do conjugado PS14-rPspA3.

Sendo assim, foi observado que o tratamento da rPspA3 com formaldeído não interferiu na imunogenicidade conferida pela mesma, já que tanto o soro anti-rPspA3 nativo como modificado apresentaram o mesmo índice de avidéz e um perfil similar de deposição de complemento. Além disso, o método empregado foi o que proporcionou maior rendimento de conjugação química para o PS14 até o presente momento sendo, também, um dos métodos recentes mais efetivos para conjugação química de polissacarídeos capsulares em geral.

O conjugado PS14-rPspA3 mostrou um aumento significativo na produção de IgG anti-PS14 em todas as doses administradas em relação ao PS14 controle (livre ou coadministrado). Estes anticorpos também apresentaram maior índice de avidéz aumentando, também, a deposição de complemento pela via clássica de ativação em relação aos controles. Além disso, o processo de conjugação permitiu a substituição de IgG3 anti-PS14 para IgG1 anti-PS14, que é a subclasse predominante em resposta à antígenos protéicos. Isso indica que a conjugação do PS14 à rPspA3 resultou na indução de um repertório de células B semelhante ao de antígenos protéicos, assim como em maior ativação destas células e maior troca de isótipo de Ig indicando, também, uma possível indução de memória imunológica pelos anticorpos induzidos pela vacina.

A imunização com o conjugado PS14-rPspA3 também resultou em um perfil semelhante na distribuição das subclasses de IgG anti-rPspA3, assim como na afinidade e atividade opsonofagocítica destes anticorpos em relação aos anticorpos induzidos pelos camundongos imunizados com a rPspA3 livre, indicando que nem a modificação da rPspA3 e nem o processo de conjugação química empregado foram capazes de alterar a imunogenicidade da rPspA3.

A indução de memória imunológica em resposta à vacinas conjugadas depende de diversos fatores como, por exemplo, o comprimento do polissacarídeo, o método de conjugação química utilizado, a relação molar de polissacarídeo e proteína obtida, a dosagem utilizada e a composição antigênica do conjugado

(incluindo tanto o polissacarídeo como o carreador proteico utilizado e o repertório de células B associadas).

Portanto, pode ser afirmado que o método apresentado neste trabalho foi efetivo, já que possibilitou a obtenção de um antígeno vacinal com características imunogênicas satisfatórias tanto para o PS14 como para a rPspA3, sendo que os anticorpos IgG anti-PS14 induzidos pelos camundongos imunizados com o conjugado apresentaram maior atividade funcional, ao passo que a atividade dos anticorpos IgG anti-rPspA3 induzidos por estes camundongos foi similar em relação aos controles imunizados com rPspA3 livre. No entanto, se a otimização do rendimento da reação de conjugação pelo método empregado é realmente possível para o sorotipo 14 deverá ser ainda objeto de estudo.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ABEYTA, M.; HARDY, G. G.; YOTHER, J. Genetic Alteration of Capsule Type but Not PspA Type Affects Accessibility of Surface-Bound Complement and Surface Antigens of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 1, p. 218-225, 2003.

ALONSO DE VELASCO, E. et al. Anti-Polysaccharide Immunoglobulin Isotype Levels and Opsonic Activity of Antisera: Relationships with Protection against *Streptococcus pneumoniae* Infection in Mice. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 562-565, 1995a.

ALONSO DE VELASCO, E. et al. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 4, p. 591-603, 1995b.

ANDRADE, A.L.C. et al. Non-typeable *Streptococcus pneumoniae* carriage isolates genetically similar to invasive and carriage isolates expressing capsular type 14 in Brazilian infants. **J. Infect.**, v. 61, p. 314-322, 2010.

ANTTILA, M. A. et al. Avidity of IgG for *Streptococcus pneumoniae* Type 6B and 23F Polysaccharide in Infants Primed with Pneumococcal Conjugates and Boosted with Polysaccharide or Conjugate Vaccines. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 1614-1621, 1998.

ARULANANDAM, B. P. et al. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A and interleukin-12 augments antibody-mediated opsonization and protective immunity against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infect. Immun.**, v. 69: 6718-6724, 2001.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BALACHANDRAN, P. et al. Role of Pneumococcal Surface Protein C in Nasopharyngeal Carriage and Pneumonia and Its Ability to Elicit Protection against Carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 5, p. 2526-2534 2002.

BAKER, P. J. T Cell Regulation of the Antibody Response to Bacterial Polysaccharide Antigens: An Examination of Some General characteristics and their Implications. **J. Infect. Dis.**, v. 165, n. 1, p. S44-S48, 1992.

BALDY, J. L. S. Estreptococcias. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Ed). **Tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

BARAZZONE, G. C.; TANIZAKI, M. M. Conjugation of *Haemophilus influenzae* Type B Capsular Polysaccharide and Tetanus Toxoid Using DMT-MM as Activating Agent. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL, INDUSTRIAL AND APPLIED MICROBIOLOGY (BioMicroWorld 2009), 3., 2009, Lisboa, Portugal. **Pôster...** Lisboa, Portugal, 2009. p. 505.

BEREZIN, E. N. et al. Distribution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in São Paulo, Brazil. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 26, n. 7, p. 643-645, 2007.

BOGAERT, D. et al. Pneumococcal Vaccines: an update on current strategies. **Vaccine**, v. 22, p. 2209-2220, 2004.

BOGAERT, D.; de GROOT, R.; HERMANS, P. W. M. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. **Lancet**, v. 4, p. 144-154, 2004.

BRANDILEONE, M. C. C. **Distribuição de sorotipos, resistência antimicrobiana e perfil molecular de *Streptococcus pneumoniae* isolado de doença invasiva no Brasil: 1993 a 1998**. 1999. 207 f. Tese (Doutorado em Infectologia) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1999.

BRANDILEONE, M. C. C. et al. Appropriateness of a Pneumococcal Conjugate Vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1206-1212, 2003.

BRANDILEONE, M. C. C. et al. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine**, v. 22, p. 3890-3896, 2004.

BRANDILEONE, M. C. C. et al. Increase in numbers of b-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **J. M. Microbiol.**, v. 55, p. 567-574, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. SUS oferece duas novas vacinas para seis milhões de crianças. 2010. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11080>. Acesso em: 14 dez. 2010.

BRICKS, L. F. Vacina Anti-Pneumocócica: eficácia em diferentes grupos de risco e recentes avanços no desenvolvimento de uma vacina mais imunogênica – Atualização, **J. Pediatr.**, v. 70, n. 2, p. 75-81, 1994.

BRICKS, L. F.; BEREZIN, E. Impact of Pneumococcal Conjugate Vaccine on the Prevention of Invasive Pneumococcal Diseases. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 3, p. S67-S74, 2006.

BRILES, D. E. et al. Mouse IgG3 antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*. **Nature**, v. 294, p. 88-90, 1981.

BRILES, D. E. et al. Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 11, p. 645-657, 1998.

BRILES, D. E. et al. Immunizations of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits antibodies that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 1694-1701, 2000.

BRILES, D. E. et al. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 188, n. 3, p. 339-348, 2003.

BROUWER, N. et al. Mannose-Binding Lectin (MBL) Facilitates Opsonophagocytosis of Yeasts but Not of Bacteria despite MBL Binding. **J. Immunol.**, v. 180, p. 4124-4132, 2008.

BROWN, J. S. et al. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **PNAS**, v. 99, n. 26, p. 16969-16974, 2002.

BRYANT, K. A. et al. Safety and Immunogenicity of a 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine. **Pediatrics**, v. 125, p. 866-875, 2010.

BUCKLEY, R. H. IgG Subclass deficiency. **Clinical Focus on Primary Immune Deficiencies: Issues and Information on current topics**, v. 1, n. 3, p. 1-4, 1998.

BUTLER, J. C. et al. Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy: An evaluation of current recommendations. **JAMA**, v. 270, N. 15, p. 1826-1831, 1993.

CAMARGOS, P. et al. Penicillin resistance and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America. **Pediatr. Respir. Rev.**, v. 7, p. 209-214, 2006.

CAO, J. et al. Enhanced protection against pneumococcal infection elicited by immunization with the combination of PspA, PspC and ClpP. **Vaccine**, v. 25, p. 4996-5005, 2007.

CAO, J. et al. Pneumococcal proteins PspA and PspC induce CXCL8 production in human neutrophils: implications in pneumococcal infections. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 12-13, p. 1051-1060, 2010.

CARDOSO, M. R. A. et al. Penicillin-resistant pneumococcus and risk of treatment failure in pneumonia. **Arch. Dis. Child.**, v. 93, p. 221-225, 2008.

CARDOZO, D. M. et al. Prevalence and risk factors for nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among adolescents. **J. M. Microbiol.**, v. 57, p. 185-189, 2008.

CARVALHO JR, R. **Produção e Purificação de um Fragmento Recombinante da Proteína A de Superfície do Clado 3 (PspA3) de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli***. 2009. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CASTAÑEDA, E. et al. Laboratory-Based Surveillance of *Streptococcus pneumoniae* Disease in Children in 10 Latin American Countries: A SIREVA II Project, 2000-2005. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, n. 9, p. e264-e270, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Streptococcus pneumoniae*. 1997. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/spneu97.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Streptococcus pneumoniae*. 2002. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/spneu02.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Streptococcus pneumoniae*. 2007. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/spneu07.pdf>>. Acesso em: 25 nov. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Streptococcus pneumoniae* Disease. 2008. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/streppneum_t.htm>. Acesso em: 25 nov. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Pneumonia Hospitalizations Among Young Children Before and After Introduction of Pneumococcal Conjugate Vaccine — United States, 1997-2006. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 58, n. 1, p. 1-4, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* Disease. 2010. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/drugresisstreppneum_t.htm>. Acesso em: 25 nov. 2010.

CHIAVOLINI, D.; POZZI, G.; RICCI, S. Animal Models of *Streptococcus pneumoniae* Disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 4, p. 666-685, 2008.

CHIOU, A. C. et al. Molecular assessment of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 in Brazil: evidence of clonal replacement. **J. M. Microbiol.**, v. 57, p. 839-844, 2008.

CHOO, S.; FINN, A. New pneumococcal vaccines for children. **Arch. Dis. Child.**, v. 84, p. 289-294, 2001.

CHUCK, A. W. et al. Pharmacoeconomic evaluation of 10- and 13-valent pneumococcal conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 28, p. 5485-5490, 2010.

COLINO, J.; SNAPPER, C. M. Dendritic Cell-Derived Exosomes Express a *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide Type 14 Cross-Reactive Antigen That Induces Protective Immunoglobulin Responses against Pneumococcal Infection in Mice. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 1, p. 220-230, 2007.

CONSTENLA, D. O. Economic impact of pneumococcal conjugate vaccination in Brazil, Chile, and Uruguay. **Pan Am. J. Public Health**, v. 24, n. 2, p. 101-112, 2008.

CSORDAS, F. C. L. et al. Protection induced by pneumococcal surface protein A (PspA) is enhanced by conjugation to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. **Vaccine**, v. 16, p. 2925-2929, 2008.

CUESTA, G. et al. Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol-sulfuric acid method. **J. Microbiol. Methods**, v. 52, p. 69-73, 2003.

DAGAN, R. et al. Dynamics of pneumococcal nasopharyngeal colonization during the first days of antibiotic treatment in pediatric patients. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 17, p. 880-885, 1998.

DAGAN, R. et al. Reduction of nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* after administration of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine in toddlers attending day care centers. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 927-936, 2002.

DAGAN, R.; LIPSITCH, M. Changing the ecology of pneumococci with antibiotics and vaccines. In: TUOMANEN, E. I.; MITCHELL, T. J.; MORRISON, D. A.; SPRATT, B. G. (Ed.). **The Pneumococcus**. Washington (DC): ASM Press, 2004. p. 283-313.

DAGAN, R. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on infectious caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15, n. 3, p. 16-20, 2009.

DAGAN, R.; POOLMAN, J.; SIEGRIST, C. Glycoconjugate vaccines and immune interference: A review. **Vaccine**, v. 28, n. 34, p. 5513-5523, 2010.

DANIELS, C. C. et al. Capsule does not block antibody binding to PspA, a surface virulence protein of *Streptococcus pneumoniae*. **Microb. Pathog.**, v. 40, n. 5, p. 228-233, 2006.

DANIELS, C. C. et al. The Proline-Rich Region of Pneumococcal Surface Proteins A and C Contains Surface-Accessible Epitopes Common to All Pneumococci and Elicits Antibody-Mediated Protection against Sepsis. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 5, p. 2163-2172, 2010.

DARRIEUX, M. S. et al. Fusion Proteins Containing Family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that correlates with antibody-mediated enhancement of complement deposition. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 5930-5938, 2007.

DARRIEUX, M. S. et al. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 273-278, 2008.

DOWSON, C. What is a pneumococcus?. In: TUOMANEN, E. I.; MITCHELL, T. J.; MORRISON, D. A.; SPRATT, B. G. (Ed.). **The Pneumococcus**. Washington (DC): ASM Press, 2004. p. 30-48.

DELVES, P. J. et al. **Roitt's Essential Immunology**. 11th ed. Malden (MA): Wiley Blackwell, 2006.

DE SCHUTTER, I. et al. Pneumococcal serogroups and serotypes in severe pneumococcal pneumonia in Belgian children: theoretical coverage of 7-valent and 9-valent pneumococcal conjugate vaccines. **Pediatr. Pulmonol.**, v. 41, p. 765-770, 2006.

DE STEFANO, F.; PFEIFER, D.; NOHYNEK, H. Safety profile of pneumococcal conjugate vaccines: systematic review of pre- and post-licensure data. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, p. 373-380, 2008.

DI FABIO, J. L. et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sireva-Vigía Group, 1993 to 1999. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 20, n. 10, p. 959-967, 2001.

DOUCE, G. et al. Novel mucosal vaccines generated by genetic conjugation of heterologous proteins to pneumolysin (PLY) from *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v. 28, p. 3231-3237, 2010.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

ECHÁNIZ-AVILÉS, I. G.; SOLÓRZANO-SANTOS, F. Meeting the challenge: Prevention of pneumococcal disease with conjugate vaccines. **Salud Pública Méx.**, v. 43, n. 4, p. 352-367, 2001.

EUROPEAN MEDICINE AGENCY. SynflorixTM. 2009. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000973/WC500054346.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2010.

FARIA, S. M.; FARHAT, C. K. Bacterial meningitis – diagnosis and treatment. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 75, n. 1, p. S46-S56, 1999.

FEDSON, D. S.; MUSER, D. M.; ESKOLA, J. Pneumococcal vaccine. In: PLOTKIN, S. A.; ORENSTEIN, W. A. (Ed.). **Vaccines**. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1999. p. 553-608.

FERRANTE, A. et al. IgG Subclass Distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 9, n. 8, p. S16-S24, 1990.

FERREIRA, D. M. et al. Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein a is characterized by a balanced immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, p. 499-505, 2008.

FINE, D. P. Pneumococcal Type-Associated Variability in Alternate Complement Pathway Activation. **Infect. Immun.**, v. 12, n. 4, p. 772-778, 1975.

FIRACATIVE, C. et al. Circulation of *Streptococcus pneumoniae* clone Colombia⁵ ST289 in nine Latin American countries. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 25, n. 4, p. 337-343, 2009.

FORSGREN, A.; RIESBECK, K.; JANSON, H. Protein D of *Haemophilus influenzae*: A protective nontypeable H. influenzae antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. 726-731, 2008.

FRANCO, C. M. et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 29, n. 1, p. 77-79, 2010.

FRASCH, C. E. Preparation of bacterial polysaccharide-protein conjugates: Analytical and manufacturing challenges. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6468-6470, 2009.

FROLET, C. et al. New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. **BMC Microbiology**, v. 10, p.190-202, 2010.

FUKUYAMA, Y. et al. Secretory-IgA Antibodies Play an Important Role in the Immunity to *Streptococcus pneumoniae*. **J. Immunol.**, v. 185, p. 1755-1762, 2010.

GARCÍA-RODRIGUEZ, J.A.; MARTINEZ, M.J.F. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, n. 2, p. 59-73, 2002.

GILLESPIE, S. H.; BALAKRISHNAN, I. Pathogenesis of pneumococcal infection. **J. Med. Microbiol.**, v. 49, p. 1057-1067, 2000.

GOLD, R. et al. Clinical evaluation of group A and group C meningococcal polysaccharide vaccines in infants. **J. Clin. Invest.**, v. 56, p. 1536-1547, 1975.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; FARO, J.; FERNÁNDEZ, C. Immune responses to polysaccharides: Lessons from humans and mice. **Vaccine**, v. 26, p. 292-300, 2008.

GORDON, S. B. et al. Intracellular trafficking and killing of *Streptococcus pneumoniae* by human alveolar macrophages are influenced by opsonins. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2286–2293, 2000.

GOULART, C. et al. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**, 2011. In press. doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.074.

GRAY, B. M.; CONVERSE III, G. M.; DILLON JR, H. C. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. **J. Infect. Dis.**, v. 142, p. 923-933, 1980.

HAKANSSON, A. et al. Characterization of the binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3372-3381, 2001.

HAMMERSCHMIDT, S. et al. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 4653-4667, 2005.

HANSMAN, D.; BULLEN, M. M. A resistant pneumococcus. **Lancet**, v. 2, p. 264-265, 1967.

HAUSDORFF, W. P. et al. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. **Clin. Infect. Dis.**, v. 30, p. 100-121, 2000.

HENCKAERTS, I. et al. Validation of a routine opsonophagocytosis assay to predict invasive pneumococcal disease efficacy of conjugate vaccine in children. **Vaccine**, v. 25, p. 2518-2527, 2007.

HENDLEY, J. O. et al. Spread of *Streptococcus pneumoniae* in families. I. Carriage rates and distribution of types. **J. Infect. Dis.**, v. 132, p. 55-61, 1975.

HENRICHSEN, J. Six newly recognized types of streptococcus pneumoniae. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 2759-2762, 1995.

HINRICHSEN, S. L. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

HOLLINGSHEAD, S. K.; BECKER, R.; BRILES, D. E. Diversity of PspA: mosaic genes and evidence for past recombination in *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 10, p. 5889-5900, 2000.

HOLLINGSHEAD, S. K. et al. Pneumococcal Surface Protein A (PspA) Family Distribution among Clinical Isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 215-221, 2006.

HORTAL, M. et al. Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Six Latin American Countries: 1993–1999 Surveillance. **Microb. Drug Resist.**, v. 7, n. 4, p. 391-401, 2001.

HUSSAIN, R. et al. Selective increases in antibody isotypes and immunoglobulin G subclass responses to secreted antigens in tuberculosis patients and healthy household contacts of the patients. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 2, n. 6, p. 726-732, 1995.

HYAMS, C. et al. The *Streptococcus pneumoniae* Capsule Inhibits Complement Activity and Neutrophil Phagocytosis by Multiple Mechanisms. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 2, p. 704-715, 2010.

INSTITUTO BUTANTAN. G. C. Barazzone et al. **Método de Conjugação de Polissacarídeo Capsular a uma Proteína Carregadora, Para Uso Como Antígeno Vacinal Contra Bactérias Encapsuladas, Utilizando o Reagente Cloreto de 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triazin-2-il)-4-metilmorfolino (DMT-MM)**. BR n. PI 090.4528-7, 26 nov. 2009.

JACOBS, M. R. et al. Changes in serotypes and antimicrobial susceptibility of invasive *Streptococcus pneumoniae* strains in Cleveland: a quarter century of experience. **J. Clin. Microbiol.**, v. 46, n. 3, p. 982-990, 2008.

JANOFF, E. N. et al. Killing of *Streptococcus pneumoniae* by capsular polysaccharide-specific polymeric IgA, complement, and phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 1139-1147, 1999.

JEDRZEJAS, M. J. Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, n. 2, p. 187-207, 2001.

JEDRZEJAS, M. J.; LAMANI, E.; BECKER, R. S. Characterization of selected strains of pneumococcal surface protein A. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 33121-33128, 2001.

JENSCH, I. et al. PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections. **Mol. Microbiol.**, v. 77, n. 1, p. 22-43, 2010.

JOHNSTON JR, R. B. Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, n. 6, p. S509-S517, 1991.

JÓDAR, L. et al. Serological criteria for evaluation and licensure of new pneumococcal conjugate vaccine formulations for use in infants. **Vaccine**, v. 21, p. 3265-3272, 2003.

KADIOGLU, A. et al. The Role of *Streptococcus pneumoniae* Virulence Factors in Host Respiratory Colonization and Disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, p. 288-301, 2008.

KANG, Y. S. et al. A Dominant Complement Fixation Pathway for Pneumococcal Polysaccharides Initiated by SIGN-R1 Interacting with C1q. **Cell**, v. 125, p. 47-58, 2006.

KÄYHTY, H.; KARANKI, H.; MÄKELÄ, P. H. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization: no evidence of immunologic tolerance or memory. **Pediatrics**, v. 74, p. 857-865, 1984.

KHAN, A. B.; LEES, A.; SNAPPER, C. M. Differential Regulation of IgG Anti-Capsular Polysaccharide and Antiprotein Responses to Intact *Streptococcus pneumoniae* in the Presence of Cognate CD4⁺ T Cell Help. **J. Immunol.**, v. 172, p. 532-539, 2004.

KIM, J. O.; WEISER, J. N. Association of intrastrain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with virulence in *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 368-377, 1998.

KLEIN, D. L.; ELLIS, R. W. Conjugate vaccines against *Streptococcus pneumoniae*. In: LEVINE, M. M.; WOODROW, G. C.; KAPER, J. B.; COBON, G. S. (Ed.). **New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 503-525.

KLUGMAN, K. P. et al. A Trial of a 9-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine in Children with and Those without HIV Infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, p. 1341-1348, 2003.

KORNFELD, S. J.; PLAUT, A. G. Secretory Immunity and the Bacterial IgA Proteases. **Rev. Infect. Dis.**, v. 3, n. 3, p. 521-534, 1981.

KOSTYUKOVA, N. N. et al. A study of pathogenic factor of *Streptococcus pneumoniae* strains causing meningitis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 10, p. 133-137, 1995.

KUNISHIMA, M. et al. Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol- and water- soluble condensing agent: DMT-MM. **Tetrahedron**, v. 57, p. 1551-1558, 2001.

LAFERRIÈRE, C. A. et al. The synthesis of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharide-tetanus toxoid conjugates and the effect of chain length on immunogenicity. **Vaccine**, v. 15, p. 179-186, 1997.

LEE, C. J.; WANG, T. R.; FRASCH, C. E. Immunogenicity in Mice of Pneumococcal Glycoconjugate Vaccines Using Pneumococcal Protein Carriers. **Vaccine**, v. 19, p. 3216-3225, 2001.

LEE, C. H. et al. Preparation and Characterization of an Immunogenic meningococcal group A conjugate vaccine for use in Africa. **Vaccine**, v. 27, p. 726-732, 2009.

LEES, A.; PUVANESARAJAH, V.; FRASCH, C. E. Conjugation chemistry. In: SIBER, G. R.; KLUGMAN, K. P.; MÄKELÄ, P. H. (Ed.). **Pneumococcal vaccines: the impact of conjugate vaccine**. ASM, Washington, D.C., 2008. cap.11. p. 163-174.

LEES, A.; SEN, G.; LOPEZ-ACOSTA, A. Versatile and efficient synthesis of protein-polysaccharide conjugate vaccines using aminoxy reagents and oxime chemistry. **Vaccine**, v. 24, p. 716-729, 2006.

LIN, H. et al. Preparation and immunogenicity of capsular polysaccharide-surface adhesin A (PsaA) conjugate of *Streptococcus pneumoniae*. **Immunobiology**, v. 215, n. 7, p. 545-550, 2010.

LINDBERG, B.; LÖNNINGREN, J.; POWELL, D. A. Structural studies on the specific type-14 pneumococcal polysaccharide. **Carbohydr. Res.**, v. 58, p. 177-186, 1977.

LINDBERG, A. A. Glycoprotein conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. S28-S36, 1999.

LING, J. M.; SCHRYVERS A. B. Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. **Biochem. Cell Biol.**, v. 84, p. 275-281, 2006.

MACKENZIE, G. A. et al. Epidemiology of nasopharyngeal carriage of respiratory bacterial pathogens in children and adults: cross-sectional surveys in a population with high rates of pneumococcal disease. **BMC Infect. Dis.**, v. 10, n. 1, p. 304, 2010.

MAGEE, A. D.; YOTHER, J. Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3755-3761, 2001.

MALFROOT, A. et al. A cross-sectional survey of the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in Belgian infants attending day care centers. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, p. 797-803, 2004.

MALLEY, R. Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. **J. Mol. Med.**, v. 88, p. 135-142, 2010.

MANTESE, O. C. et al. Prevalence of serotypes and antimicrobial resistance of invasive strains of pneumococcus in children: analysis of 9 years. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 85, n. 6, p. 495-502, 2009.

MARTNER, A. et al. *Streptococcus pneumoniae* Autolysis Prevents Phagocytosis and Production of Phagocyte-Activating Cytokines. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 9, p. 3826-3837, 2009.

MASSALDI, H. A. Desarrollo, producción y control de calidad de conjugados polisacárido-proteína para elaboración de una vacuna contra el *Streptococo pneumoniae*. Proyecto Uruguay. Facultad de Medicina. Universidad de la República. 2000. Disponible em: <<http://ris.bvsalud.org/finals/URU-1457.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

MATO, R. et al. Natural history of drug-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* colonizing healthy children in Portugal. **Microb. Drug. Resist.**, v. 11, p. 309-322, 2005.

MATTHAY, K. K. et al. Evaluation of the opsonic requirements for phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* serotypes VII, XIV, and XIX by chemiluminescence assay. **Infect. Immun.**, v. 31, p. 228-235, 1981.

MAWAS, F.; FEAVERS, I. M.; CORBEL, M. J. Serotype of *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide Can Modify the Th1/Th2 cytokine profile and IgG Subclass Response to Pneumococcal-CRM197 Conjugate Vaccines in a Murine Model. **Vaccine**, v. 19, p. 1159-1166, 2000.

MAWAS, F. et al. Immunogenicity in a mouse model of a conjugate vaccine made with a synthetic single repeating unit of type 14 pneumococcal polysaccharide coupled to CRM197. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5107-5114, 2002.

MCDANIEL, L. S. et al. Monoclonal antibodies against protease sensitive pneumococcal antigens can protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. **J. Exp. Med.**, v. 160, p. 386-397, 1984.

MCDANIEL, L. S. et al. Use of insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). **J. Exp. Med.**, v. 165, p. 381-394, 1987.

MCDANIEL, L. S. et al. PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, is capable of eliciting protection against pneumococci of more than one capsular type. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 222-228, 1991.

MCLAY, J. et al. Susceptibility to Fatal Pneumococcal Sepsis Due to Absence of Anti Polysaccharide IgG3 Is Corrected by Induction of Anti-Polysaccharide IgG1. **J. Immunol.**, v. 168, p. 3437-3443, 2002.

MITCHELL, A. M.; MITCHELL, T. J. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 16, p. 411-418, 2010.

MIYAJI, E. N. et al. PsaA (pneumococcal surface adhesin A) and PspA (pneumococcal surface protein A) DNA vaccines induce humoral and cellular immune responses against *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine**, v. 20, p. 805-812, 2002.

MORETTI, G. R. F. et al. Vacina pneumocócica: histórico, indicações clássicas e efeitos indiretos. **Pulmão RJ**, v. 16, n. 2-4, p. 91-96, 2007.

MORONA, J. K.; MORONA, R.; PATON, J. C. Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae* type 2 is require for invasive disease. **PNAS**, v. 103, p. 8505-8510, 2006.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química Orgânica**. 14. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

NABORS, G. S. et al. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. **Vaccine**, v. 18, p. 1743-1754, 2000.

NICOLETTI, C. et al. Prevalence, serotypes, and risk factors for pneumococcal carriage among HIV-infected adults. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, n. 3, p. 259-265, 2007.

NOVAK, R.; TUOMANEN, E. Pathogenesis of pneumococcal pneumoniae. **Semin. Respir. Infect.**, v. 14, p. 209-217, 1999.

O'BRIEN, K. L.; SANTOSHAM, M. Potential impact of conjugate pneumococcal vaccines on pediatric pneumococcal diseases. **Am. J. Epidemiol.**, v. 159, p. 634-644, 2004.

O'BRIEN, K. L. et al. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **Lancet**, v. 374, p. 893-902, 2009.

OGUNNIYI, A. D. et al. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 1, p. 350-357, 2007.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; GRUMACH, A.S. Subclasses de IgG e sua Importância em Pediatria. **Pediatria**, v. 16, n. 2, p. 60-66, 1994.

PERCIANI, C. T. et al. Improved method to calculate the antibody avidity index. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 21, n. 3, p. 201-206, 2007.

PETTIGREW, M. M. et al. Variation in the presence of neuraminidase genes among *Streptococcus pneumoniae* isolates with identical sequence types. **Infect. Immunol.**, v. 74, p. 3360-3365, 2006.

PIMENTA, F. C. et al. Genetic Diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during ongoing surveillance study of children in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 8. p. 2838-2843, 2006.

PNEUMOCOCCAL MOLECULAR EPIDEMIOLOGY NETWORK. 2010. Disponível em: <http://www.sph.emory.edu/PMEN/pmen_ww_spread_clones.html>. Acesso em: 20 nov. 2010.

POLAND, G. A. The burden of pneumococcal disease: the role of conjugate vaccines. **Vaccine**, v. 17, p. 1674-1679, 1999.

POULSEN, K.; REINHOLDT, J.; KILIAN, M. Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* Immunoglobulin A1 Protease Gene (*iga*) and Its Translation Product. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 10, p. 3957-3966, 1996.

PRICE, K. E.; CAMILLI, A. Pneumolysin Localizes to the Cell Wall of *Streptococcus pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 7, p. 2163-2168, 2009.

QI., X. Y.; KEYHANI, N. O.; LEE, Y. C. Spectrophotometric determination of hydrazine and their mixtures with trinitrobenzenesulfonic acid. **Anal. Biochem.**, v. 175, p. 139-144, 1988.

QUADROS, C. A. From global to regional: The importance of pneumococcal disease in Latin America. **Vaccine**, v. 27S, p. C29-C32, 2009.

QUAGLIARELLO, V.; SHIELD, M. Bacterial Meningitis: Pathogenesis, Pathophysiology, and Progress. **New England J. Med.**, v. 327, p. 864-872, 1992.

RAMAKRISHNAN, M.; FOREMAN, M. M. Pneumococcal conjugate vaccines. 2008a. Pneumo slide set, chapter 3. Disponível em: <<http://www.preventpneumo.org/data-tools/slides.cfm>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

RAMAKRISHNAN, M.; FOREMAN, M. M. Preventing Pneumonia & Pneumococcal Disease: The Way Forward. 2008b. Pneumo slide set, chapter 4. Disponível em: <<http://www.preventpneumo.org/data-tools/slides.cfm>>. Acesso em: 20 nov. 2010.

RAPPUOLI, R. New and Improved Vaccines against Diphtheria and Tetanus. In: LEVINE, M. M.; WOODROW, G. C.; KAPER, J. B.; COBON, G. S. (Ed.). **New generation vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 422-423.

REN, B. et al. Both Family 1 and Family 2 PspA Proteins Can Inhibit Complement Deposition and Confer Virulence to a Capsular Serotype 3 Strain of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 1, p. 75-85, 2003.

REN, B. et al. Effects of PspA and Antibodies to PspA on Activation and Deposition of Complement on the Pneumococcal Surface. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 1, p. 114-122, 2004.

ROSSONI, A. M. O. et al. Acute bacterial meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae* resistant to the antimicrobial agents and their serotypes. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 66, n. 3-A, p. 509-515, 2008.

ROY, S. et al. MBL genotype and risk of invasive pneumococcal disease: a case-control study. **Lancet**, v. 359, p. 1569-1573, 2002.

RUBIN, L. G. Pneumococcal Vaccine. **Pediatr. Clin. North Am.**, v. 47, p. 269-285, 2000.

RUBINS, J. B. et al. Magnitude, duration, quality and function of pneumococcal vaccine responses in elderly adults. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 2, p. 431-440, 1998.

SABHARWAL, V. et al. Role of Complement in Host Defense against Pneumococcal Otitis Media. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 3, p. 1121-1127, 2009.

SAELAND, E. et al. Role of Leukocyte Immunoglobulin G Receptors in Vaccine-Induced Immunity to *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 1686-1693, 2003.

SCHNEERSON, R. et al. Quantitative and qualitative analyses of serum antibodies elicited in adults by *Haemophilus influenzae* type b and pneumococcus type 6A capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. **Infect. Immun.**, v. 52, p. 519-528, 1986.

SERRANO, I.; MELO-CRISTINO, J.; RAMIREZ, M. Heterogeneity of pneumococcal phase variants in invasive human infections. **BMC Microbiology**, v. 6, p. 67, 2006.

SHAPER, M. et al. PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 5031–5040, 2004.

SILVEIRA, I. A. et al. Characterization and immunogenicity of meningococcal group C conjugate vaccine prepared using hydrazide activated tetanus toxoid. **Vaccine**, v. 25, n. 41, p. 7261-7270, 2007.

SIMELL, B.; KILPI, T.; KÄYHTY, H. Subclass distribution of natural salivary IgA antibodies against pneumococcal capsular polysaccharide of type 14 and pneumococcal surface adhesin A (PsaA) in children. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 143, p. 543-549, 2006.

SOININEN, A. et al. Assignment of Immunoglobulin G1 and G2 Concentrations to Pneumococcal Capsular Polysaccharides 3, 6B, 14, 19F, and 23F in Pneumococcal Reference Serum 89-SF. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, n. 4, p. 561-566, 1998.

SWIATLO, E.; WARE, D. Novel vaccine strategies with protein antigens of *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 38, p. 1-7, 2003.

TART, R. C. et al. Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 380-386, 1996.

TUOMANEN, E. I. The biology of pneumococcal infection. **Pediatr. Res.**, v. 42, n. 3, p. 253-258, 1997.

TONNAER, E. L. G. M. et al. Advances in understanding the pathogenesis of pneumococcal otitis media. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 25, p. 546-552, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TYLLIANAKIS, P. E. et al. Direct colorimetric determination of solid-supported functional groups and ligands using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v. 219, n. 2, p. 335-340, 1994.

USINGER, W. R.; LUCAS, A. H. Avidity as a Determinant of the Protective Efficacy of Human Antibodies to Pneumococcal Capsular Polysaccharides. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 5, p. 2366-2370, 1999.

VALLÈS, X. et al. Serotype-specific pneumococcal disease may be influenced by mannose-binding lectin deficiency. **Eur. Respir. J.**, v. 36, p. 856-863, 2010.

VAN EMMERIK, L. C. et al. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 97, p. 411-416, 1994.

VELA-CORAL, M. C. et al. Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 7, p. 832-836, 2001.

VLIEGENTHART, J. F. G. Carbohydrate based vaccines. **FEBS Letters**. v. 580, p. 2945-2950, 2006.

WEISER, N. J. et al. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 2582-2589, 1994.

WHATMORE, A. M.; DOWSON, C. G. The autolysin-encoding gene (*lyt A*) of *Streptococcus pneumoniae* displays restricted allelic variation despite localized recombination events with genes of pneumococcal bacteriophage encoding cell wall lytic enzymes. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4551-4556, 1999.

WOLKERS, P. C. B. et al. New susceptibility breakpoints in antimicrobial resistance rates of invasive pneumococcal strains. **J. Pediatr. (Rio J.)**, v. 85, n. 5, p. 421-425, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire**: WHO recommended measures for persons undertaking international travel from areas affected by Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS), v. 78, n. 14, p. 97–120, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations for the production & control of pneumococcal conjugate vaccines**. WHO Technical Report Series, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire**: Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper, v. 82, n. 12, p. 93–104, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Estimated pneumococcal deaths and cases. 2009a. Disponível em: <http://www.who.int/immunization_monitoring/burden/Pneumo_hib_estimates/en/index2.html>. Acesso em: 10 nov. 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Invasive Bacterial Diseases (IBD) Information and Surveillance Bulletin Reporting Period: January through December 2008**. 2009b. v. 1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Countries Using Pneumococcal Conjugate Vaccine in National Immunization Schedule (2008). 2009c. Disponível em: <http://search.who.int/search?q=Countries+Using+Pneumococcal+Conjugate&ie=utf8&site=default_collection&client=_en&proxystylesheet=_en&output=xml_no_dtd&oe=utf8>. Acesso em: 15 jul. 2010.

WYSOCKI, J. et al. Immunogenicity of the 10-Valent Pneumococcal Non-typeable *Haemophilus influenzae* Protein D Conjugate Vaccine (PHiD-CV) When Coadministered With Different *Neisseria meningitidis* Serogroup C Conjugate Vaccines. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 28, p. S77-S88, 2009.

YOO, I. H. et al. Role of pneumococcal pneumolysin in the induction of an inflammatory response in human epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 60, p. 28-35, 2010.

YOTHER, J. Capsules. In: TUOMANEN, E. I.; MITCHELL, T. J.; MORRISON, D. A.; SPRATT, B. G. (Ed.). **The Pneumococcus**. Washington (D.C.): ASM Press, 2004. p. 30-48.

YUSTE, J. et al. Impaired Opsonization with C3b and Phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in Sera from Subjects with Defects in the Classical Complement Pathway. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 8, p. 3761-3770, 2008.

YUSTE, J. et al. The Effects of PspC on Complement-Mediated Immunity to *Streptococcus pneumoniae* Vary with Strain Background and Capsular Serotype. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 1, p. 283-292, 2010.

ANEXO A – CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

Montagem da Curva Padrão com Dextranas em Resina Sephacryl S-400

Condições de Trabalho:

Fase Móvel: NaCl 0,2M;

Fluxo de corrida: 1mL/min;

Volume das frações coletadas: 3mL.

A **Tabela 1** abaixo apresenta os padrões utilizados para a calibração da coluna cromatográfica, assim como o log da massa molar, a constante de distribuição (Kd) e o volume de eluição (V_e) para cada um deles nas condições estabelecidas acima.

Tabela 1 – Dados para calibração da coluna cromatográfica com dextranas.

Dextran	Massa Molar (MM)	Log MM	Kd	Volume de Eluição (mL)
Dextran 10kDa	10.000 Da	4	0,672897	148
Dextran 40kDa	40.000 Da	4,6	0,504673	130
Dextran 70kDa	70.000 Da	4,85	0,448598	124
Dextran 229kDa	229.000 Da	5,36	0,336449	112
Blue Dextran	2.000.000 Da	6,3	0	76

Através do volume de eluição encontrado para cada padrão utilizado nas condições estabelecidas, calcula-se a Kd de cada um deles através da fórmula $[Kd=(V_e-V_0)/(V_f-V_0)]$, onde V_0 = volume morto (volume de eluição do Blue Dextran) e V_f = volume final de eluição (volume total da coluna). O volume da coluna é calculado através da fórmula: $V = \pi \cdot r^2 \cdot h$, onde π (pi): 3,14; r^2 (raio ao quadrado): $(0,8)^2$ e h (altura da coluna): 91cm, obtendo-se um V_f de 183mL. Em seguida, uma curva padrão relacionando estas constantes com a massa molar média (em log) destes padrões é montada. Desta forma, uma amostra com massa molar média desconhecida pode ter o seu volume de eluição relacionado aos volumes de eluição dos padrões estimando-se, então, a sua massa molar média.

A **Figura 1** abaixo mostra o perfil cromatográfico de dextranas utilizadas como padrão para calibração da coluna de exclusão molecular em resina Sephacryl S-400.

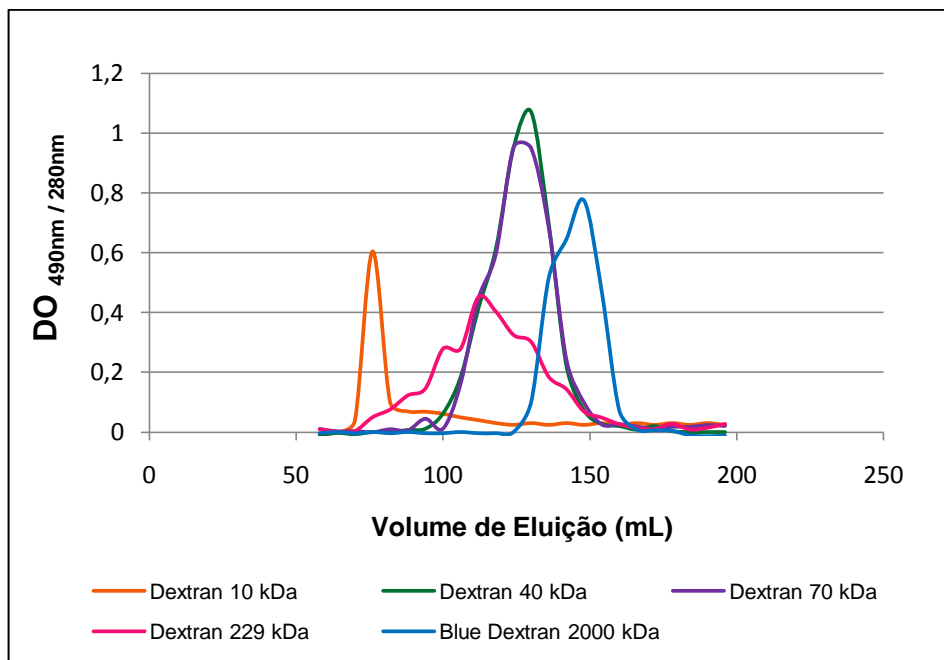


Figura 1: Cromatograma do Perfil de Eluição de Dextranas em Resina Sephacryl S-400. Dextranas foram utilizadas como padrão para eluição em resina Sephacryl S-400. A leitura para as dextranas foi feita no comprimento de onda de 490nm. Para o Blue Dextran, a leitura foi feita à 280nm. Fase móvel: NaCl 0,2M. Fluxo: 1mL/min.

A **Figura 2** abaixo mostra a curva de calibração obtida para o cálculo da massa molar média das amostras de interesse a partir dos padrões eluídos.

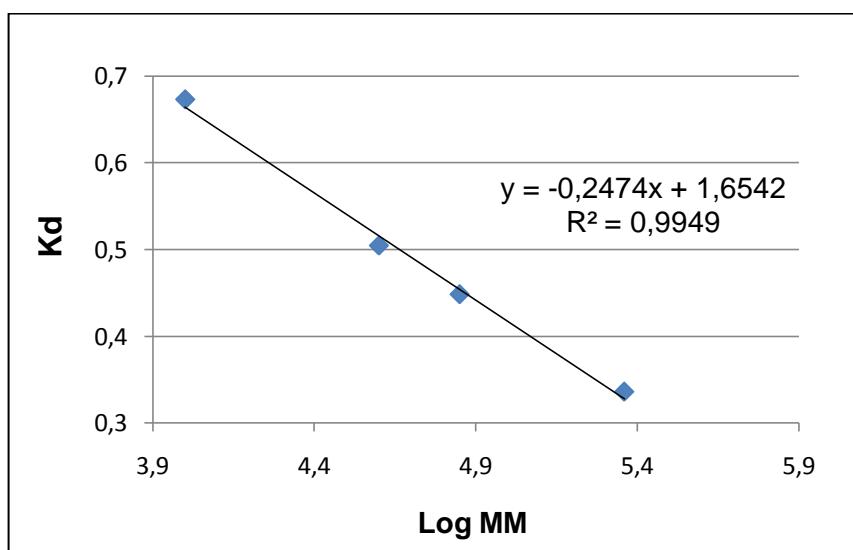


Figura 2: Curva de Calibração da Coluna Sephacryl S-400. Curva de calibração utilizada para o cálculo da massa molar média obtida a partir dos padrões eluídos em resina Sephacryl S-400.