

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Caracterização *in silico* da proteína Sortase A de
Streptococcus pneumoniae e avaliação de seu potencial
imunogênico em modelo animal**

Jéssica Amanda Marques Souza

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

CO-ORIENTADOR (A): Dra. Sophie Yvette Leclercq

BELO HORIZONTE

JUNHO - 2015

JÉSSICA AMANDA MARQUES SOUZA

**Caracterização *in silico* da proteína Sortase A de
Streptococcus pneumoniae e avaliação de seu potencial
imunogênico em modelo animal**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani

CO-ORIENTADOR (A): Dra. Sophie Yvette Leclercq

BELO HORIZONTE

JUNHO - 2015



Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais

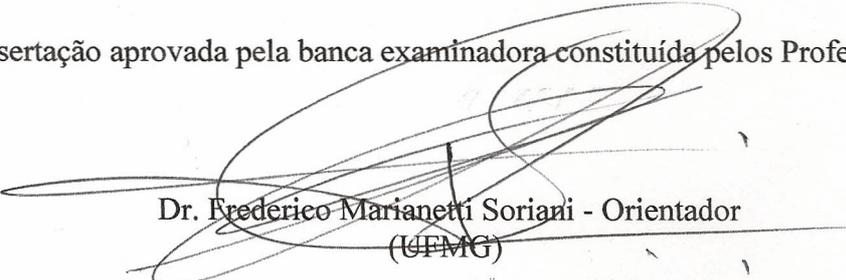
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

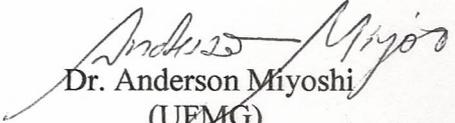


"Caracterização in silico da proteína Sortase A de Streptococcus pneumoniae e avaliação de seu potencial imunogênico em modelo animal"

Jéssica Amanda Marques Souza

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Dr. Frederico Marianetti Soriani - Orientador
(UFMG)


Dr. Anderson Miyoshi
(UFMG)


Dr. Vicente de Paulo Martins
(UnB)

Belo Horizonte, 17 de julho de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Tua graça que me conduz sempre me mostrando o melhor caminho.

Ao Professor Dr. Frederico Soriani, pela oportunidade e confiança ao me receber no Laboratório de Genética Funcional. Me faltam palavras para expressar o tamanho da gratidão que tenho por tudo que você fez durante o meu mestrado. Sua orientação foi muito importante na minha formação profissional e pessoal. **MUITO OBRIGADA!**

À Dra. Sophie, pela oportunidade, auxílio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos, paciência e por acreditar no meu potencial. Eu não chegaria até aqui se não fosse pelo seu incentivo.

Ao Professor Dr. Anderson Miyoshi, pela disponibilidade e ensinamentos antes e após a aprovação no Programa de Pós-Graduação em Genética.

A todos os colegas que são ou um dia fizeram parte do Laboratório de Inovação Biotecnológica da FUNED, em especial: Débora, Thais, Janete, Gabriela, Verônica, Máira, Aline, Wellington e Rhayssa. Obrigada por toda solicitude, pelos conselhos e por dividirem comigo meus momentos de aflições e também de alegrias.

À Ana Valentim, pela imensa colaboração na purificação de proteínas. Muito obrigada!

À Dra. Alessandra Matavel por todos os conselhos e disponibilidade em ajudar quando sempre precisei.

Ao Dhian e toda equipe do laboratório de Doenças Bacterianas e Fúngicas da FUNED, pela colaboração e por disponibilizarem material e espaço para a execução de experimentos.

A todos os profissionais da FUNED, em especial aos colegas do Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento, que participaram direta ou indiretamente deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Genética Funcional da UFMG: Nathália, Karina, Isabella, Marina, Tauany e Marieta. Obrigada pelo carinho ao me receberem, pela força, pelos conselhos, e por toda a ajuda durante as análises e experimentos. Vocês são dez!

Aos laboratórios dos Professores Dr. Mauro Teixeira e Dra. Danielle Souza por disponibilizarem espaço e recursos.

À Luciana por todo auxílio e disponibilidade em ajudar nos experimentos de infecção.

À UFMG, ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Genética pela oportunidade.

A todos os professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Genética.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos meus pais Diva e Carlos, pelo apoio, amparo nos momentos difíceis e por não me deixarem desistir. Obrigada por serem compreensíveis e me darem tudo que precisei para que eu conseguisse concluir mais esse objetivo. Amo vocês!

Ao meu irmão Filipe, familiares e amigos que sempre estiveram torcendo por mim.

Ao Lucas, meu maior incentivador. Obrigada por todo amor, carinho, compreensão e por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Te amo!

A todos que de alguma forma participaram da realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 O micro-organismo <i>Streptococcus pneumoniae</i>.....	3
1.2 Aspectos imunológicos associados ao <i>S. pneumoniae</i>	4
1.3 Sintomas e Diagnóstico	9
1.4 Dados epidemiológicos	9
1.5 Tratamento	11
1.6 Vacinas	11
1.6.1 Tipos de vacinas	12
1.6.2 Vacinas pneumocócicas	13
1.7 Proteínas pneumocócicas de importância imunogênica	14
1.7.1 A proteína Sortase A	16
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVO	19
3.1 Objetivos específicos	19
4 METODOLOGIA	20
4.1 Caracterização <i>in silico</i> da proteína SrtA	20
4.1.1 Predição de peptídeo sinal e hélice transmembrana	20
4.1.2 Alinhamento de sequências e construção da árvore filogenética	20
4.1.3 Predição de epítomos	21
4.2 Produção heteróloga da proteína SrtA	21
4.2.1 Extração do DNA genômico de <i>S. pneumoniae</i>	21
4.2.2 Amplificação da ORF codificadora da proteína SrtA por PCR	21
4.2.3 Clonagem da ORF <i>srtA</i>	22
4.2.3.1 Digestão, desfosforilação e reação de ligação	23
4.2.3.2 Preparo de células <i>Escherichia coli</i> NM522 quimiocompetentes	24
4.2.3.3 Transformação bacteriana utilizando células <i>E. coli</i> NM522 quimiocompetentes	24
4.2.3.4 PCR de colônias para seleção de clones positivos	25
4.2.4 Reação de sequenciamento	25

4.2.5	Transformação da <i>E. coli Rosetta gami</i> com o vetor pET-21a/ <i>srtA</i> e expressão da proteína SrtA	26
4.2.6	Purificação da proteína SrtA recombinante	27
4.2.7	Western blot para confirmação da presença da cauda de histidina e da imunogenicidade da proteína recombinante SrtA	28
4.3	Avaliação do potencial imunogênico da proteína SrtA recombinante	29
4.3.1	Imunização dos camundongos e avaliação da resposta humoral	29
4.3.2	Determinação da DL ₅₀ para desafio intranasal	30
4.3.3	Avaliação da resposta inflamatória	30
4.3.4	Desafio intranasal e intraperitoneal	31
4.3.5	Análises estatísticas	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	Caracterização <i>in silico</i> da SrtA	32
5.1.1	Predição de peptídeo sinal e hélice transmembrana	32
5.1.2	Alinhamento de sequências de SrtA e construção da árvore filogenética	34
5.1.3	Predição de epítomos	37
5.1.3.1	Predição de epítomos lineares para linfócitos B	37
5.1.3.2	Predição de epítomos para linfócitos T	42
5.2	Produção heteróloga da proteína SrtA	42
5.2.1	Amplificação da ORF <i>srtA</i>	43
5.2.2	Clonagem da ORF <i>srtA</i>	44
5.2.3	Expressão da proteína SrtA em <i>Escherichia coli Rosetta gami</i>	47
5.2.4	Purificação da proteína SrtA recombinante	48
5.2.5	Confirmação da presença da cauda de histidina e imunogenicidade da SrtA por Western blot	49
5.3	Avaliação do potencial imunogênico da proteína SrtA	49
5.3.1	Avaliação da resposta imune humoral	49
5.3.2	Determinação da DL ₅₀ para desafio intranasal	52
5.3.3	Avaliação da resposta inflamatória	53
5.3.4	Desafio intranasal e intraperitoneal	56
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	59
6.1	Conclusões	59
6.2	Perspectivas	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cocos de <i>S. pneumoniae</i>	3
Figura 2. Ativação da resposta inflamatória por <i>S. pneumoniae</i>	6
Figura 3. Ativação de linfócitos B	7
Figura 4. Causas globais de óbitos em crianças em 2013	10
Figura 5. Estrutura celular e proteínas do pneumococo	15
Figura 6. Ancoragem de proteínas de superfície mediada por SrtA	17
Figura 7. Mapa do vetor pET-21a	23
Figura 8. Esquema do sistema de indução de expressão por IPTG	27
Figura 9. Representação esquemática da estrutura da proteína SrtA de <i>S. pneumoniae</i> ...	32
Figura 10. Predição de peptídeo sinal da proteína SrtA	33
Figura 11. Predição do domínio transmembrana da proteína SrtA	33
Figura 12. Árvore filogenética do gene <i>srtA</i> de <i>S. pneumoniae</i>	36
Figura 13. Epítomos lineares de células B	38
Figura 14. Predição da hidrofobicidade da SrtA	40
Figura 15. Predição de resíduos acessíveis da proteína SrtA	41
Figura 16. Amplificação da ORF <i>srtA</i>	43
Figura 17. Digestão do plasmídeo pET-21a	44
Figura 18. Confirmação dos produtos de PCR amplificados de colônias	45
Figura 19. Sequenciamento pET-21a/ <i>srtA</i>	45
Figura 20. Alinhamento da sequência nucleotídica ao gene <i>srtA</i> no programa ClustalW2 .	46

Figura 21. Cinética de expressão e teste de solubilidade	47
Figura 22. Purificação da proteína SrtA recombinante	48
Figura 23. Western blot para confirmação da cauda de histidina e imunogenicidade da proteína SrtA	49
Figura 24. Níveis de anticorpos IgG anti-SrtA do soro de camundongos após três imunizações	50
Figura 25. Níveis de subclasses de anticorpos IgG do soro de camundongos após três imunizações	51
Figura 26. Determinação da DL50 de camundongos desafiados com <i>S. pneumoniae</i> via intranasal	53
Figura 27. Contagem total de células por BAL	54
Figura 28. Contagem diferencial de células por BAL	55
Figura 29. Avaliação da sobrevivência dos camundongos após infecção intranasal	57
Figura 30. Avaliação da sobrevivência dos camundongos após infecção intraperitoneal	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores	22
Tabela 2. Protocolo experimental para a PCR	22
Tabela 3. Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento	26
Tabela 4. Epítomos preditos de linfócitos B	39

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC** – Células apresentadoras de antígenos (do inglês “*Antigen-presenting cell*”)
- BAL** – Lavado broncoalveolar
- BCR** – Receptor de célula B
- BLAST** – *Basic Local Alignment Search Tool*
- BSA** – Albumina sérica bovina
- CaCl₂** – Cloreto de cálcio
- CDC** – *Centers for Disease Control and Prevention*
- CEUA** – Comitê de Ética em Pesquisa Animal
- C₆H₈O₇** – Ácido cítrico
- CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLR** – Receptor de lectina tipo C
- CO₂** – Dióxido de carbono
- Cps** – Cápsula polissacarídica
- CTL** – Linfócito T citotóxico
- DAB** – 3, 3'-diaminobenzidina
- ddNTP** – Dideoxynucleotídeo trifosfato
- DL** – Dose letal
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico (do inglês “*Deoxyribonucleic acid*”)
- DO** – Densidade óptica
- DPI** – Doença pneumocócica invasiva
- EDTA** – Ácido etilendiaminotetraacético
- ELISA** – Ensaio de imunoadsorção ligado a enzima
- Eno** – Enolase
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- FUNED** – Fundação Ezequiel Dias
- g** – Grama
- g** – Força-G
- Gts** – Glutamil-tRNA sintetase
- HCl** – Ácido clorídrico
- HLA** – Antígeno leucocitário humano (do inglês “*Human leukocyte antigen*”)
- H₂O₂** – Peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄** – Ácido sulfúrico
- Hyl** – Hialuronidase
- IEDB** – *Immune Epitope Database and Analysis Resource*
- Ig** – Imunoglobulina

IL – Interleucina
IPTG – β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
IRF – Fator regulatório de interferon
LB – Luria-Bertani
LIB – Laboratório de Inovação Biotecnológica
LPS – Lipopolissacarídeo
LTA – Ácido lipoteicóico
LytA – Autolisina
M – Mol
MBL – Lectina de ligação à manose
mg – Miligrama
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês “*Major histocompatibility complex*”)
mL – Mililitro
mM – Milimolar
NaCl – Cloreto de sódio
Na₂CO₃ – Carbonato de sódio
NaHCO₃ – Bicarbonato de sódio
Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico
NaH₂PO₄ – Fosfato monosódico
NanA – Neuraminidase
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
NLR – Receptor de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo
nm – Nanômetro
ORF – Fase de leitura aberta (do inglês “*Open reading frame*”)
OMS – Organização Mundial da Saúde
OPD – O-fenilenodiamina
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês “*Pathogen-associated molecular patterns*”)
PavA – Proteína de adesão e virulência A
pb – Pares de bases
PBS – Tampão fosfato-salino
PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”)
PCV – Pevnar
Pdb – Derivado de pneumolisina B
PG – Peptideoglicano

pH – Potencial hidrogeniônico

Pia/PiuA – Proteína pneumocócica de transporte de ferro

Ply – Pneumolisina

pmol – Picomole

PotD – Proteína de transporte de poliamina D

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões (do inglês “*Pattern recognition receptors*”)

PsaA – Adesina de superfície pneumocócica A

PspA – Proteína de superfície pneumocócica A

PspC – Proteína de superfície pneumocócica C

PsrP – Proteína pneumocócica rica em repetições de serina

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês “*Ribonucleic acid*”)

rpm – Rotações por minuto

SDBF – Serviço de doenças bacterianas e fúngicas

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio

SPGDB – *Streptococcus pneumoniae Genome Database*

SrtA – Sortase A

TCR – Receptor de célula T

Th – T helper

TLR – Receptor do tipo Toll

TNF – Fator de necrose tumoral

tRNA – RNA transportador

UFC – Unidade formadora de colônia

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VCAM – Molécula de adesão celular-vascular-1

µg – Micrograma

µL – Microlitro

°C – Grau celsius

RESUMO

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva de ampla dispersão mundial. É o principal agente etiológico de infecções pulmonares, meningite e sepse, sendo classificados mais de 90 sorotipos. Embora as vacinas existentes, baseadas em antígenos polissacarídeos, sejam eficientes, elas não conferem proteção contra vários sorotipos, e têm-se observado surgimento de doenças causadas por sorotipos não inclusos nas vacinas. Com o intuito de superar essas desvantagens e conferir uma proteção mais ampla, busca-se o desenvolvimento de uma vacina baseada em antígenos proteicos conservados entre os diferentes sorotipos de *S. pneumoniae*. Neste trabalho, selecionamos a proteína Sortase A (SrtA) que está ancorada a membrana do *S. pneumoniae* e possui um importante papel no processamento de proteínas de superfície. O objetivo foi avaliar as características imunogênicas da SrtA e o nível de conservação de sua sequência entre diferentes linhagens de *S. pneumoniae* através de análises *in silico*, além de avaliar seu potencial protetor em modelo animal. A partir das análises *in silico* foi possível determinar que a SrtA apresenta um peptídeo sinal compreendendo os resíduos Met¹ até Asp¹⁰ e uma hélice transmembrana entre Lis¹³ a Tre³⁵. Sequências SrtA de diferentes linhagens de *S. pneumoniae* foram alinhadas e as análises demonstraram 99% de identidade. Além disso, foram feitas predições de epítomos que demonstraram que a proteína SrtA possui três potenciais regiões antigênicas para ativação de linfócitos B. Já com relação aos epítomos de linfócitos T foram preditos epítomos na região entre os aminoácidos 33 e 137. Para confirmar a funcionalidade da SrtA como potencialmente imunogênica, o gene *srtA* foi clonado no vetor de expressão heteróloga pET-21a. A proteína foi expressa em *Escherichia coli* e após a sua purificação, sua imunogenicidade foi avaliada por Western blot utilizando soro de coelho imunizado com SrtA. Camundongos Swiss Webster foram imunizados com SrtA recombinante por via intraperitoneal e a resposta humoral foi analisada indicando que a proteína induziu a produção de IgG específica, caracterizada por uma alta taxa de IgG1 e IgG2a. Os camundongos foram desafiados e a resposta inflamatória foi avaliada. Os resultados indicaram que a SrtA é capaz de controlar o infiltrado celular no pulmão, mas não é capaz de modular o perfil de células inflamatórias. O potencial protetor da SrtA também foi avaliado utilizando como rotas de desafio as vias intranasal ou intraperitoneal. Observou-se que a SrtA é capaz de conferir proteção aos camundongos vacinados. Em conclusão, foi possível mostrar que a proteína SrtA é altamente conservada, entre diferentes linhagens de *S. pneumoniae*, e que é altamente imunogênica, gerando efeito protetor, *in vivo*. Estes resultados demonstram o potencial multivalente da SrtA para o desenvolvimento de uma vacina que possa produzir uma maior cobertura contra diferentes sorotipos de *S. pneumoniae*.

ABSTRACT

Streptococcus pneumoniae is a world-wide spread Gram-positive bacteria. It is the main etiological agent of lung infection, meningitis and sepsis, with more than 90 characterized serotypes. Although vaccines, based on polysaccharides antigens, are effective, they do not confer protection against many serotypes and it has been observed the appearance of disease caused by serotypes not included in these vaccines. With the purpose to overcome those disadvantages and confer a wider protection, it is sought to develop a vaccine based on conserved protein antigens among different *S. pneumoniae* serotypes. In this study, we have selected the Sortase A protein (SrtA) which is anchored to *S. pneumoniae* membrane and has an important role in pneumococcus surface protein processing. In this way, we aimed to evaluate the immunogenic characteristics of SrtA and the conservation levels of its sequence among different *S. pneumoniae* strains through *in silico* analysis, besides to evaluate its protection potential in animal models. *In silico* analysis showed the presence of a signal peptide from residues Met¹ to Asn¹⁰ and a transmembrane helix from Lys¹³ to Thr³⁵ in SrtA. Alignment of SrtA sequences from different *S. pneumoniae* strains showed 99% of identity. Moreover, epitope predictions demonstrated that SrtA has 3 potential antigenic sites for B lymphocytes activation. With regard to epitopes T lymphocytes activation, 178 epitopes were predicted within the region between residues 33 to 137. In order to confirm the immunogenic properties of SrtA, its ORF was cloned into the heterologous expression vector, pET-21a. *Escherichia coli* heterologous expressed protein was purified and its immunogenicity was evaluated by Western Blot using rabbit serum. Swiss Webster mice were intraperitoneally immunized with recombinant SrtA and the humoral response was accessed by specific IgG production, characterized by high levels of IgG1 and IgG2a. Immunized mice were challenged and the inflammatory response was evaluated. Results showed that SrtA is able to control cellular lung infiltrate, but unable to modulate the profile of inflammatory cells. The protective potential of SrtA was also evaluated using intraperitoneal and intranasal infection routes. It has been observed that SrtA was able to confer protection to vaccinated mice. In conclusion, we demonstrated that SrtA is a highly conserved protein, among different *S. pneumoniae* strains, and also immunogenic, providing *in vivo* protection. Altogether, results have shown the multivalent potential of SrtA to the development of a vaccine able to produce a larger coverage against different serotypes of *S. pneumoniae*.

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito de uma colaboração entre o Laboratório de Inovação Biotecnológica (LIB) da Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e o Laboratório de Genética Funcional (LGF) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Professor Dr. Frederico Marianetti Soriani (LGF – UFMG) e co-orientação da Dra. Sophie Yvette Leclercq (LIB – FUNED).

1.1 O micro-organismo *Streptococcus pneumoniae*

O gênero *Streptococcus* é um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas. São classificados com base na morfologia da colônia, tipo de hemólise em meio de cultura ágar sangue, reações bioquímicas e especificidade sorológica. Vários *Streptococcus* são considerados importantes para a microbiota normal de animais e seres humanos, porém alguns podem também ocasionar doenças, como *S. pneumoniae* (PATTERSON, 1996).

S. pneumoniae foi isolado pela primeira vez por Louis Pasteur em 1881. É uma bactéria Gram-positiva, oval, e suas células estão dispostas aos pares ou em cadeias curtas (Figura 1) (MURRAY et al., 2004; CDC, 2012).

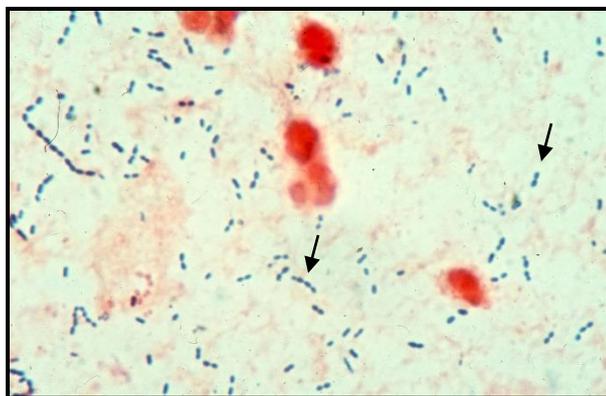


Figura 1: Cocos de *S. pneumoniae*. Amostra de escarro corada pelo método de coloração de Gram. Os cocos de *S. pneumoniae* estão indicados pela seta preta.

Fonte: <http://www.microbeworld.org>

S. pneumoniae faz parte da microbiota comensal do trato respiratório superior e, embora a colonização seja, principalmente, assintomática, esta pode evoluir para uma doença respiratória ou até mesmo sistêmica (VELASCO et al., 1995; BOGAERT et al., 2004). Sendo assim, o pneumococo expressa uma matriz de fatores de virulência de forma coordenada permitindo que a invasão dos tecidos seja bem sucedida.

Dentre estes fatores, *S. pneumoniae* possui uma cápsula polissacarídica que é o seu principal fator de virulência, a qual reduz a sua retenção nas secreções mucosas presentes na cavidade nasal. Quase todas as cápsulas polissacarídicas pneumocócicas são carregadas negativamente, o que poderia aumentar a sua repulsão aos mucopolissacarídeos que são encontrados no muco. A camada inferior à cápsula, a parede celular, consiste em polissacarídeos e ácido teicóico e serve como uma âncora para proteínas de superfície do pneumococo associadas à parede celular. Estas proteínas por sua vez, medeiam a adesão do pneumococo ao revestimento epitelial do trato respiratório. A adesão destas proteínas a carboidratos presentes na superfície das células epiteliais é o processo pelo qual ocorre a colonização assintomática (BOGAERT et al., 2004).

No geral, a colonização não é seguida por uma doença sintomática. A conversão de uma colonização assintomática para uma doença invasiva requer a produção local de fatores inflamatórios. A cascata inflamatória muda o tipo e o número de receptores da célula epitelial alvo. O pneumococo por sua vez interage com estes receptores por intermédio de proteínas presentes na superfície de sua parede celular. Esta interação pode resultar na internalização dos pneumococos resultando na invasão de bactérias vivas. Os fatores pneumocócicos que permitem que as barreiras epiteliais do tecido do hospedeiro sejam violadas durante a progressão da colonização para a infecção invasiva são pouco compreendidos. (BOGAERT et al., 2004; KADIOGLU et al., 2008).

1.2 Aspectos imunológicos associados ao *S. pneumoniae*

Uma das funções fisiológicas do sistema imune é a defesa contra agentes infecciosos. A defesa contra estes agentes é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e as respostas tardias da imunidade adaptativa (ABBAS et al., 2008).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e é mediada pelos fagócitos. Este tipo de resposta baseia-se no reconhecimento de micro-organismos através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Os PRRs são capazes de reconhecer componentes microbianos conhecidos como padrões associados a patógenos (PAMPs). Diferentes PAMPs interagem com PRRs específicos, ativam vias de sinalização e levam a respostas distintas (AKIRA et al., 2006).

Os PRRs são expressos em células do sistema imune inato e em outros tipos de células como as epiteliais. Esses receptores podem ser classificados em três famílias com base em suas funções. A primeira família refere-se aos receptores que são expressos na superfície das células e medeiam o reconhecimento e internalização dos micro-organismos. Entre essas moléculas são encontrados os receptores CD14 e receptor de lectina tipo C (CLR). A segunda família é constituída pelos receptores de sinalização, que incluem os

receptores do tipo Toll (TLRs) e os receptores de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NLRs). Receptores desta família podem ser expressos na superfície das células ou intracelularmente. Já a terceira família de PRRs é composta por moléculas solúveis, também chamadas de opsoninas, que facilitam o reconhecimento e eliminação pelos fagócitos, além de algumas também serem envolvidas na ativação da via do complemento. Os TLRs são os PRRs mais amplamente estudados e são considerados como sendo os sensores primários contra agentes patogênicos (JEANNIN et al., 2008; KUMAR et al., 2011; SHIN & BRODSKY, 2015).

Os TLRs reconhecem, coletivamente, lipídeos, carboidratos, peptídeos e ácidos nucleicos e podem ser expressos, extra ou intracelularmente, em várias células imunitárias, incluindo macrófagos, células dendríticas, células B, tipos específicos de células T e em outros tipos de células como fibroblastos e células epiteliais. Os TLRs que estão localizados na superfície das células são do tipo 1, 2, 4, 5 e 6 e reconhecem PAMPs provenientes de bactérias, fungos e protozoários. Os localizados no compartimento intracelular são do tipo 3, 7, 8 e 9 e reconhecem ácidos nucleicos derivados de vírus e bactérias. Esses receptores regulam a resposta imune através da ativação de vários fatores de transcrição como NF- κ B e IRF 3/7 que, por sua vez, induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e interferon tipo I (AKIRA et al., 2006; TRINCHIERI & SHER, 2007; KUMAR et al., 2011; PORTOU et al., 2015).

O TLR2 desempenha um importante papel na detecção de bactérias Gram-positivas, incluindo o pneumococo, e está envolvido no reconhecimento do ácido lipoteicoico (LTA), lipoproteínas e peptidoglicano (PG). O TLR4 foi identificado, primariamente, em reconhecer LPS (lipopolissacarídeo), mas ele reconhece também outros ligantes como a pneumolisina (Ply) produzida pelo *S. pneumoniae*. O DNA bacteriano também possui atividade inflamatória que é reconhecido pelo TLR9 (AKIRA et al., 2006; CALBO & GARAU, 2011; KUMAR et al., 2011). Após a ativação destes receptores, a célula libera várias citocinas que induzem uma cascata de reações inflamatórias, incluindo o recrutamento de neutrófilos. As principais citocinas liberadas pelas células fagocíticas são o fator de necrose tumoral (TNF- α), a interleucina-1 β (IL-1 β) e a IL-6. IL-1 β e TNF- α agem sobre as células endoteliais vasculares locais, aumentam a permeabilidade e a vasodilatação e regulam positivamente moléculas de adesão, como, por exemplo, a E-selectina, P-selectina e a molécula de adesão celular-vascular 1 (VCAM-1), para permitir o influxo de neutrófilos e outros linfócitos do sangue para o local da infecção (Figura 2) (KANAMORI et al., 2011).

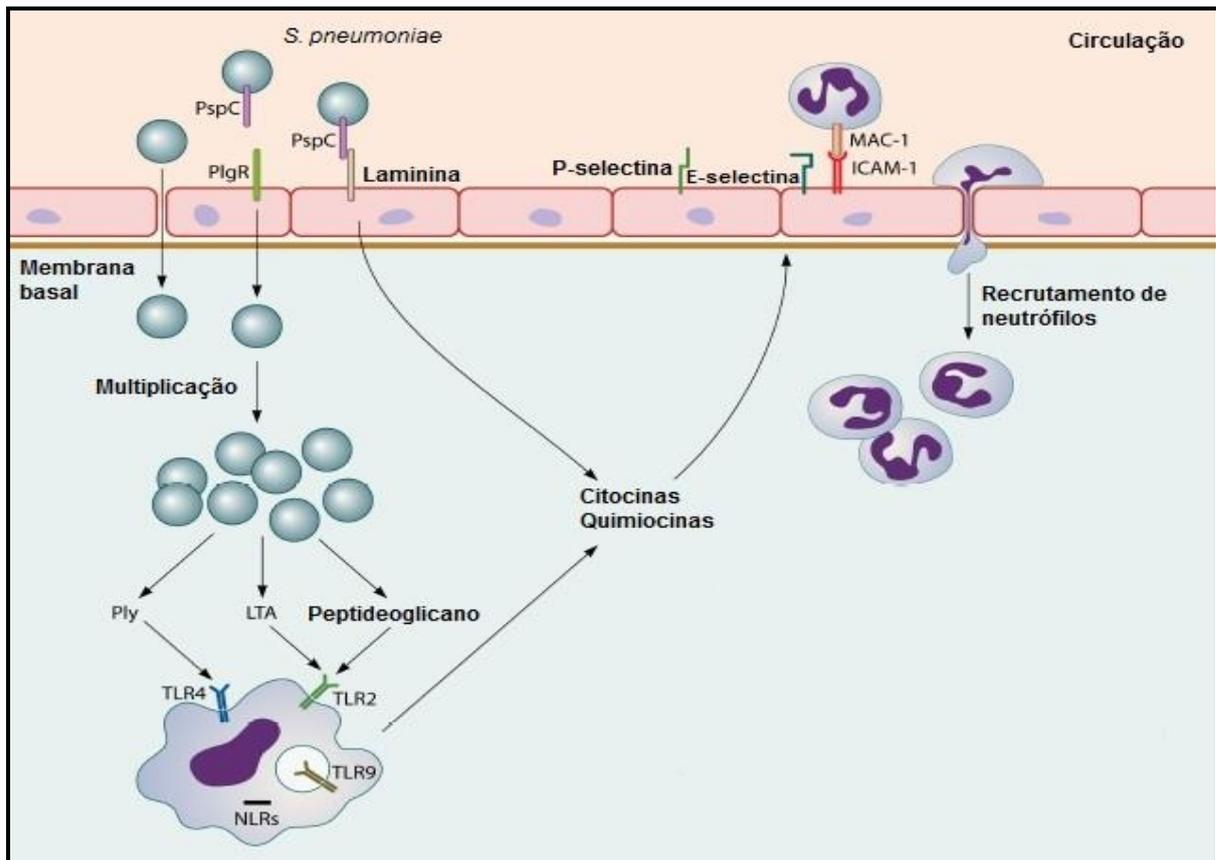


Figura 2: Ativação da resposta inflamatória por *S. pneumoniae*. Os receptores TLRs são ativados por diferentes fatores de *S. pneumoniae* que induzem a produção de citocinas e quimiocinas permitindo o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção.

Fonte: Adaptado de Kanamori et al., 2011.

O sistema do complemento é uma parte do sistema imune inato e é constituído de proteínas séricas e de membrana que contribuem para a defesa do hospedeiro. O sistema procede através de três vias controladas: a via clássica, a de lectina e a alternativa (ALBERTS et al., 2002; DEGN & THIEL, 2013). A via clássica é dependente de anticorpos e ocorre quando anticorpos circulantes se ligam a patógenos específicos e, apenas IgM e IgG, são capazes de ativar o complemento suficientemente (EHRNTHALLER et al., 2011). Ao contrário da via clássica, a via de lectina não reconhece complexo antígeno anticorpo, esta via emprega receptores codificados por uma linha germinal de PRRs, como lectina de ligação a manose (MBL), que pode ligar a PAMPs comuns de vários micro-organismos. E a via alternativa é ativada quando C3, que é muito abundante no plasma, sofre hidrólise espontânea e se liga à superfície de patógenos. A ativação do complemento culmina em cascatas proteolíticas que terminam na opsonização e lise do patógeno (DUNKELBERGER & SONG, 2010). Em mecanismos de defesa contra *S. pneumoniae*, a importância do complemento é confirmada pelo fato de que o pneumococo utiliza uma variedade de mecanismos de evasão, incluindo a cápsula que contribui para a proteção contra a opsonofagocitose (PATERSON & ORIHUELA, 2010).

Durante os mecanismos da resposta imune inata, moléculas de sinalização liberadas começam a mobilizar forças para o sistema imune adaptativo (ALBERTS et al., 2002). As respostas imunes adaptativas são altamente específicas para um agente patogênico em particular e também podem fornecer proteção a longo prazo. Este sistema é baseado em linfócitos, receptores antigênicos adaptativos (BCR e TCR) e pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que, em humanos, é conhecido como antígeno leucocitário humano (HLA) (ALBERTS et al., 2002; FLAJNIK & PASQUIER, 2004; DANILOVA & AMEMIYA, 2009).

Durante a resposta imune, os linfócitos B podem ser ativados diretamente por micro-organismos invasores, seja por detecção de PAMPs através de PRRs, ou de antígenos específicos através do BCR. A ativação direta de linfócitos B leva a uma diferenciação destas células em plasmócitos, que são células de vida curta e produtoras de anticorpos de baixa especificidade (Figura 3) (NOTHELFER et al., 2015). Este tipo de resposta ocorre independente da participação de linfócitos T e, portanto, é denominada de T-independente sem a formação de memória imunológica, também conhecida como imunidade humoral (WEINTRAUB, 2003).

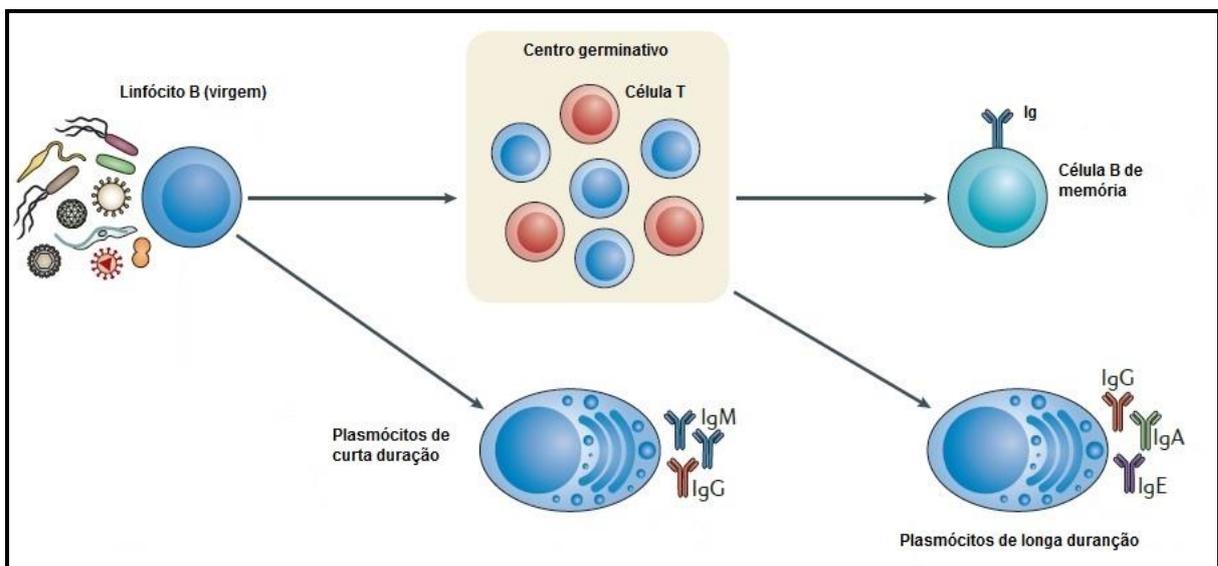


Figura 3: Ativação de linfócitos B. Representação esquemática das respostas T-independente e T-dependente.

Fonte: Adaptado de Nothelfer et al., 2015.

A imunidade celular mediada pelos linfócitos T baseia-se em determinantes proteicos. A ativação destas células ocorre através do reconhecimento de antígenos que estão ligados a moléculas de MHC de classe I ou II. As células apresentadoras de antígenos (APCs) são as responsáveis em apresentar antígenos aos linfócitos T, mediante moléculas de MHC. Antígenos provenientes de agentes patogênicos extracelulares são apresentados por APCs,

por intermédio de moléculas de MHC de classe II aos linfócitos T CD4⁺, também conhecidos como T *helper* (Th) (VYAS et al., 2008; RAMACHANDRA et al., 2009; ELIOS et al., 2011). Em resposta a patógenos, células Th podem se diferenciar em Th1, Th2 ou Th17, sendo que a natureza da resposta pode ser influenciada por diferentes agentes invasores (NETEA et al., 2005; ELIOS et al., 2011). Diferentes tipos de células Th produzem perfis distintos de citocinas com um papel central na modulação das respostas imunes. Células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e interferon- γ (INF- γ) e estão envolvidos na imunidade celular. Células Th2, por outro lado, produzem IL-4, IL-5 e IL-13 e estão envolvidos na imunidade humoral, regulando a proliferação de células B e a mudança de classe de anticorpos. Já as células Th17 produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-17 e desempenham um importante papel na indução da inflamação (DONG & FLAVELL, 2001; SAITO et al., 2010). As respostas mediadas por Th17 são essenciais na depuração de bactérias colonizadoras, como o pneumococo, porém fagócitos efetores de depuração bacteriana, dependentes de células Th17, podem variar se o hospedeiro tiver sido previamente exposto a bactéria (DOCKRELL et al., 2012).

Células Th também cooperam com linfócitos B para a produção de anticorpos que opsonizam micro-organismos extracelulares e neutralizam suas toxinas (ELIOS et al., 2011). Para isto, linfócitos B apresentam antígenos aos linfócitos T, via molécula MHC de classe II. A interação dessas células resulta na ativação de co-receptores na superfície de linfócitos B, como CD40, que interage com CD40L de linfócitos T CD4⁺. Esta ativação conduz a uma maturação de afinidade de anticorpos gerando plasmócitos de vida longa e linfócitos B de memória (Figura 3) (NOTHELPER et al., 2015). A memória imunológica é caracterizada pela capacidade de reagir, especificamente e mais rapidamente, a patógenos ou antígenos. Esta resposta rápida e eficiente é a base da vacinação (GOURLEY et al., 2004).

Antígenos provenientes de patógenos intracelulares, como vírus e bactérias, são apresentados pelas APCs via moléculas de MHC de classe I aos linfócitos T CD8⁺, também conhecidos como citotóxicos (CTLs) (VYAS et al., 2008). A ativação de linfócitos T CD8⁺ não resulta somente em proliferação, mas também na diferenciação da célula ativada, e neste caso podem ser divididas em quatro grupos: virgem, célula de memória, efetor/memória e efetora. Um linfócito T CD8⁺ virgem muda para o estado de memória em resposta a exposição a um antígeno transformando-se, gradualmente, em efetor. CTLs de memória, não conseguem destruir a célula alvo, mas podem proliferar e produzir citocinas em resposta a um antígeno. CTL efetor/memória produz níveis elevados de citocinas e possui atividade citotóxica limitada e células efetoras expressam níveis elevados de perforinas e apresentam forte atividade citolítica. A classificação fenotípica para distinguir entre linfócitos virgem, memória e efetor é dada pela distinção dos receptores co-estimuladores CD27 e CD28 bem como CD45RA ou CD45RO (ANDERSEN et al., 2006).

1.3 Sintomas e Diagnóstico

O estado imunológico do indivíduo, bem como a virulência da linhagem, é que irá determinar se o pneumococo permanecerá confinado a nasofaringe ou tornar-se-á invasivo. (VELASCO et al., 1995; BOGAERT et al., 2004). *S. pneumoniae* pode causar, principalmente, pneumonia, meningite e sepse em crianças e adultos e é a causa mais comum de otite média aguda em crianças (LYNCH & ZHANEL, 2010). A infecção pneumocócica pode provocar uma irritação leve nas vias aéreas superiores, seguida de tosse e expectoração, devido a proliferação bacteriana e resposta inflamatória nos alvéolos, além de febre devido a liberação de citocinas e outras substâncias pirogênicas. Outros sintomas como dificuldade de respirar e dor torácica podem aparecer e a presença de dores de cabeça, dor ou rigidez no pescoço levantam o espectro de meningite (MUSHER, 1992; TORTORA et al., 2005; POLL & OPAL, 2009).

O diagnóstico pode ser feito isolando o pneumococo da garganta, escarro e outros líquidos e inoculado em placas, contendo meio de cultivo ágar sangue, e incubadas em estufa CO₂ a 37°C. As colônias são umbilicadas e α-hemolíticas, devido a produção de pneumolisina que causa hemólise parcial das hemácias, formando um halo esverdeado, resultado da oxidação da hemoglobina em meta-hemoglobina pelo peróxido de hidrogênio secretado pela bactéria. Sendo assim, exige meio suplementado com produtos sanguíneos. Duas inovações de diagnóstico também estão disponíveis e podem ser bastante úteis. A primeira é a detecção de um do polissacarídeo C da parede celular pneumocócica, na urina, por um ensaio de imunocromatografia. Este ensaio é mais sensível em doenças pneumocócicas graves e é especialmente útil em pacientes que possuem dificuldade de se obter uma amostra de escarro adequada. A segunda são ensaios baseados em ácidos nucleicos de pneumococo (MURRAY et al., 2002; POLL & OPAL, 2009).

1.4 Dados epidemiológicos

A transmissão do pneumococo ocorre através de secreções respiratórias. A susceptibilidade é geral, entretanto os principais acometidos são as crianças com até 5 anos de idade, porém as crianças menores de 1 ano e adultos com mais de 65 anos são mais vulneráveis à doença. Os indivíduos portadores de doenças crônicas ou imunossupressoras também possuem maior susceptibilidade de serem infectados e adoecerem (LYNCH & ZHANEL, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE(A), 2014).

Conforme já mencionado, o pneumococo é um agente causador de pneumonia, otite média, meningite e sepse. Sendo assim, a infecção causada por *S. pneumoniae* é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (FIOCRUZ, 2009). Em 2012,

a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou que a pneumonia é a doença que mais causa mortes em crianças menores de cinco anos em todo o mundo. Desses óbitos, mais de 99% seriam registrados em países em desenvolvimento (FIOCRUZ, 2013). De acordo com dados levantados por Liu e colaboradores (2015), em 2013, de 6,3 milhões de óbitos mundiais em crianças de até 5 anos de idade, 14,9% foram provocados por pneumonia (Figura 4).

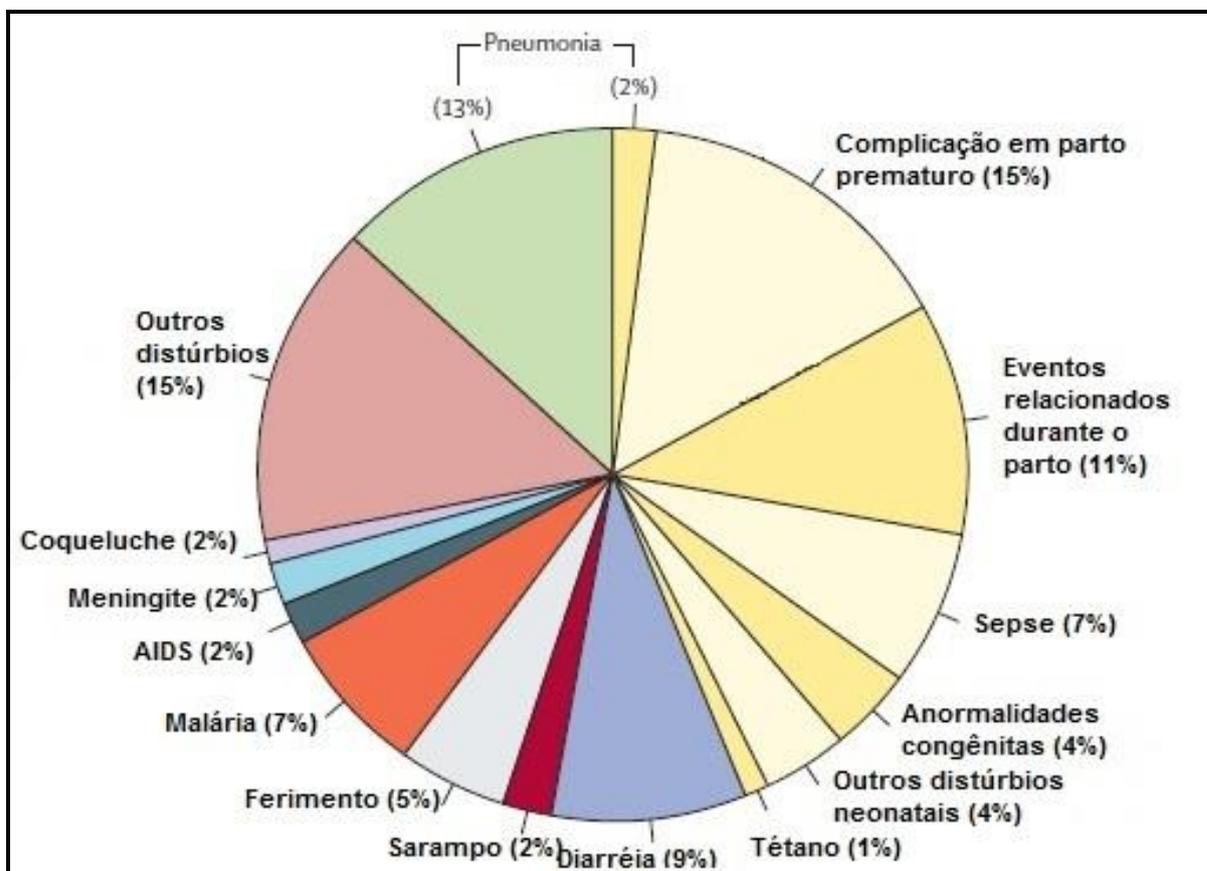


Figura 4: Causas globais de óbitos em crianças em 2013.

Fonte: Adaptado de LIU et al., 2015.

Em 2000, o pneumococo foi responsável por 14,5 milhões de casos de pneumonia e sepse, e 826.000 óbitos em crianças de até 5 anos de idade. Estas estimativas foram obtidas com base em casos de ocorrência nas regiões da África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Europa, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (BRIEN et al., 2009).

Segundo o Boletim da Organização Mundial da Saúde, o Brasil está entre os 15 países com maior incidência de pneumonia em crianças menores de 5 anos, sendo que existem ainda 1,8 milhões de novos casos por ano no país (RUDAN, et al., 2008). A pneumonia é considerada uma importante causa de hospitalização no SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). No período de 2004-2006 a doença pneumocócica foi responsável por 34.217 internações, sendo que destas, 64,8% foram ocasionadas por pneumonia pneumocócica (SANTOS et al., 2013).

O pneumococo é considerado a segunda maior causa de meningite bacteriana no Brasil. Entre 2000 e 2008, manteve-se uma média anual de 1.250 casos de meningite pneumocócica e de 370 óbitos por ano. Em Minas Gerais, neste mesmo período, foram registrados 1.026 casos de meningite pneumocócica e 310 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

1.5 Tratamento

O uso da penicilina foi considerado como tratamento de escolha para pneumonia adquirida na comunidade desde 1940. Porém, em meados de 1970, linhagens resistentes de *S. pneumoniae* foram identificadas e estes clones espalharam-se pelo mundo todo. Esta resistência é causada, principalmente, por alterações nas proteínas ligadoras de penicilina que por sua vez permitem a síntese do peptidoglicano mesmo na presença de penicilina. Algumas linhagens que expressam resistência intermediária podem ser tratadas com β -lactâmicos de segunda e terceira geração (SCHUTZE et al., 1994; POLL & OPAL, 2009).

A resistência antimicrobiana aos macrolídeos, fluoroquinolonas, vancomicina, trimetoprim, e vários outros agentes antimicrobianos, também tem sido observada no mundo todo. Quando viável, pneumococos isolados de pacientes muito doentes devem ser submetidos a testes de sensibilidade para garantir um tratamento seguro. Este teste é essencialmente importante em áreas geográficas onde a resistência aos antibióticos convencionais é um problema conhecido (POLL & OPAL, 2009).

A resistência aos antimicrobianos é um problema crescente e de grande importância, pois compromete a eficácia terapêutica. Desta forma, torna-se ainda mais importante a prevenção das infecções causadas por *S. pneumoniae* via vacinação. Atualmente, existem vacinas disponíveis para o pneumococo que, mesmo não sendo capazes de conferir uma ampla cobertura contra todos os sorotipos existentes, podem evitar as formas mais graves (FIOCRUZ, 2013).

1.6 Vacinas

A descoberta, realizada por Jenner, de uma vacina contra a varíola há quase dois séculos, foi de grande importância para a medicina moderna. Desde então a vacinação tornou-se a forma mais eficiente de evitar algumas doenças. O objetivo das vacinas é imunizar o indivíduo para que seu sistema imunológico possa responder, de forma rápida e eficiente, quando entrar em contato com agente infeccioso, evitando assim o desenvolvimento e agravamento da doença (LILJEQVIST & STAHL, 1999; MIR et al., 2004).

Considerando os aspectos imunológicos apresentados neste trabalho, o controle ou eliminação de uma doença requer a indução de uma imunidade protetora e isto é alcançado por programas de imunização capazes de induzir uma proteção a longo prazo. Este tipo de imunidade é conferido pela indução de células imunes de memória que possam ser suficientemente eficientes e agir rapidamente em caso de exposição ao agente patogênico (SIEGRIST, 2008).

1.6.1 Tipos de vacinas

Atualmente existem três tipos de vacinas: primeira geração, segunda geração e terceira geração que foram subdivididas conforme as novas tecnologias vacinais foram desenvolvidas.

As vacinas de primeira geração representam aquelas que empregam em sua composição o agente patogênico, porém submetido a tratamentos que levam a atenuação ou inativação do micro-organismo. As vacinas vivas atenuadas compreendem uma versão enfraquecida do agente patogênico. São produzidas pela modificação de um vírus ou bactéria selvagem e “imitam” uma imunidade protetora induzida em indivíduos após uma infecção. Uma dose, relativamente pequena, do micro-organismo é administrada e replica-se o suficiente para desencadear uma resposta imune. Vacinas contra a febre amarela e poliomielite estão neste grupo. As vacinas inativadas são formuladas por organismos não vivos, podendo ser constituídas por qualquer vírus ou bactérias inteiras, ou frações destes, como, por exemplo, as constituídas de polissacarídeos. Um exemplo deste tipo de vacina é a pneumocócica 23-Valente (CDC, 2011; PULENDRAN & AHMED, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE(B), 2014).

As vacinas inativadas constituídas de polissacarídeos presentes na cápsula do patógeno induzem uma resposta do tipo T-independente, o que gera uma resposta de curto prazo e sem células de memória. Estas vacinas não conferem resposta eficiente em crianças menores de dois anos, provavelmente devido à imaturidade do sistema imune. Em 1980, suspeitou-se que, se a vacina polissacarídica fosse conjugada a uma proteína, o problema com a resposta deficiente poderia ser superado. Sendo assim, surgiram as vacinas conjugadas (SIEGRIST, 2008; CDC, 2011). As vacinas conjugadas possuem seus polissacarídeos constituintes ligados quimicamente a uma proteína carreadora. Essa conjugação permite ativar uma resposta T-dependente e, conseqüentemente, gerar uma maior resposta e memória imunológica (PULENDRAN & AHMED, 2011).

As vacinas de segunda geração são produzidas através da tecnologia do DNA recombinante. Surgiram com a noção de que, em alguns patógenos, a proteção vacinal pode ser obtida após a indução de anticorpos para um único alvo. Sua produção se dá basicamente

pela escolha de um gene de determinado microrganismo capaz de codificar uma proteína que seja de relevância para a proteção contra a doença. Este gene é inserido em um plasmídeo que irá permitir a transcrição do gene em bactérias, leveduras ou células de mamíferos (LILJEQVIST & STAHL, 1999). Atualmente, a vacina disponível para humanos com este tipo de formulação é a vacina para hepatite B.

As vacinas de DNA são consideradas as vacinas de terceira geração, estas são um novo avanço no campo da imunização. Nessas vacinas emprega-se a informação genética do patógeno responsável pela codificação de proteínas que representem antígenos relevantes para proteção (SAHA et al., 2011). Neste caso os plasmídeos transformados são utilizados para imunização. Para essa tecnologia vacinal, ainda não existe nenhuma disponível para uso humano, somente para uso veterinário.

1.6.2 Vacinas pneumocócicas

Devido ao *S. pneumoniae* ser considerado uma das importantes causas de morbimortalidade em todo o mundo, atualmente estão disponíveis no mercado várias vacinas contra o pneumococo sendo estas de primeira geração.

As vacinas pneumocócicas atuais são constituídas de polissacarídeo capsular de *S. pneumoniae* (KADIOGLU et al., 2008). Os esforços para se desenvolver uma vacina pneumocócica eficaz começaram em 1911. Porém, com o advento das penicilinas esse interesse diminuiu, até que foi observado muitos pacientes ainda morrerem, mesmo sendo tratados com antibióticos. Sendo assim, no final dos anos 1960, novos esforços foram concentrados para se desenvolver uma vacina pneumocócica polivalente (CDC, 2012).

Praticamente todas as linhagens de *S. pneumoniae* possuem uma cápsula polissacarídica que constitui a base para sua sorotipagem com base nas diferentes estruturas desses polissacarídeos. A nomenclatura dinamarquesa classifica os sorotipos de acordo com características estruturais e antigênicas (VELASCO et al., 1995). Atualmente, existem mais de 90 sorotipos de *S. pneumoniae*, globalmente 20 sorotipos são responsáveis por mais de 80% das doenças pneumocócicas invasivas (DPI). Os sorotipos associados a DPI em todo o mundo incluem 1, 3, 4, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Em crianças a predominância é limitada sendo 6, 14, 18, 19 e 23F os mais frequentes. A distribuição dos sorotipos difere entre regiões geográficas e além disso muda ao longo do tempo (LYNCH & ZHANEL, 2010).

A primeira vacina pneumocócica que foi desenvolvida é a 14-valente em 1977. Porém, esta foi substituída pela 23-valente, licenciada nos Estados Unidos em 1983. Esta é constituída de 23 antígenos polissacarídeos, 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, fabricada pela Merck and Company, Inc (Pneumovax 23) e Lederle Laboratories (Pnu-Immune 23) (CDC, 1997).

Infelizmente, esses antígenos polissacarídeos possuem a desvantagem de desencadear uma resposta T-independente e, portanto, não induzem uma memória imunológica. Essa desvantagem foi superada, então, com a conjugação a proteínas carreadoras capazes de desencadear uma resposta T-dependente (KADIOGLU et al., 2008). Sendo assim, foi desenvolvida a Prevnar 7 (PCV-7), em 2000, nos Estados Unidos. Esta foi a primeira vacina contra o *S. pneumoniae* conjugada a uma proteína diftérica (CRM₁₉₇). A PCV-7 protege contra 7 sorotipos diferentes. Nela estão inclusos polissacarídeos dos sorotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F. Estes sorotipos foram considerados responsáveis por 83% das doenças invasivas em crianças menores de 4 anos de idade (BLACK et al., 2000). Esta vacina teve um grande impacto, sendo observada queda significativa das infecções por *S. pneumoniae*, tanto em adultos quanto em crianças. A terceira vacina que foi desenvolvida, a Synflorix 10 (PCV-10), possui três sorotipos a mais que a PCV-7, que são 1, 5 e 7F. Em 2010, essa vacina foi incluída no Calendário Básico de Imunização pelo Programa Nacional de Imunizações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Por fim, em 2010 foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) a Prevnar 13 (PCV-13) que possui os sorotipos inclusos na PCV-10 acrescidos de mais três, 3, 6A e 19A (CILLÓNIZ et al., 2012).

Embora as vacinas existentes possuam, em sua composição, os sorotipos mais prevalentes, estas não são capazes de conferir uma ampla proteção vacinal contra *S. pneumoniae*. Além disso, foi mostrado que a pressão seletiva exercida pelo uso da vacina induz uma redistribuição dos sorotipos circulantes diminuindo, assim, a eficácia ao longo dos anos (HUANG et al., 2005). Sendo assim, busca-se o desenvolvimento de uma vacina baseada em um antígeno proteico conservado entre vários sorotipos de *S. pneumoniae*, de maneira a aumentar a cobertura vacinal e estimular uma resposta T-dependente no sistema imune, sem a necessidade de conjugação a uma outra proteína.

1.7 Proteínas pneumocócicas de importância imunogênica

Ao longo dos últimos 15 anos, a importância das proteínas pneumocócicas tornou-se evidente. A pesquisa nessa área tem sido estimulada pela percepção de que essas proteínas representam um caminho promissor para o desenvolvimento de vacinas (KADIOGLU et al., 2008). Algumas proteínas já foram identificadas e classificadas quanto a sua virulência e o seu potencial de proteção foi avaliado quando empregada em uma vacina, como a Proteína de Superfície do Pneumococo A (PspA) e Proteína de Superfície do Pneumococo C (PspC) (Figura 5).

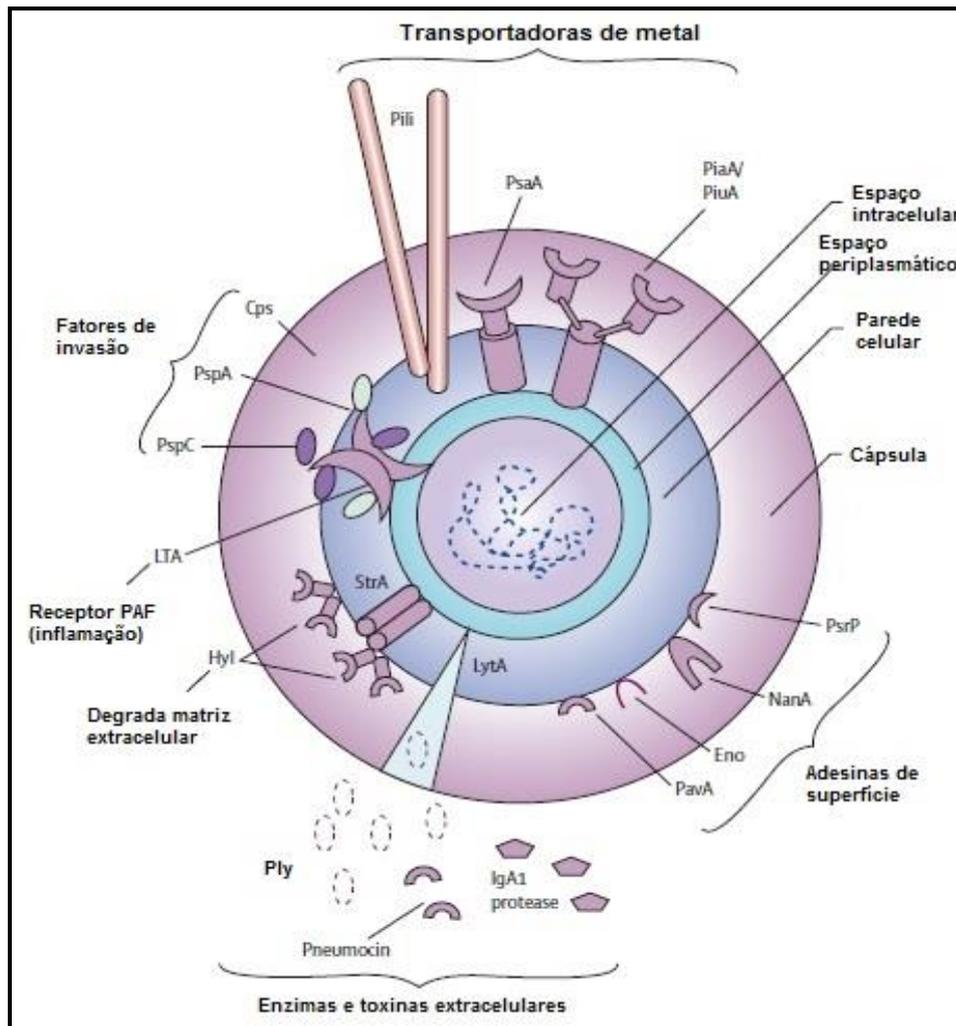


Figura 5: Estrutura celular e proteínas do pneumococo. *S. pneumoniae* possui uma cápsula polissacarídica (Cps) e secreta proteínas que contribuem com diferentes mecanismos de evasão (Ply e protease IgA1). Além disso o pneumococo possui diversas proteínas como importantes fatores de virulência e que podem ser utilizadas como potenciais alvos vacinais, como as proteínas de superfície (PspA, PspC e Cps), adesão pneumocócica (PsrP, NanA, Eno e PavA), ligação a metais (Pili, PsaA e PiaA/ PiuA), ancoragem de proteínas a parede celular (StrA), autolisina (LytA) e hialuronidase (Hyl).

Fonte: POLL & OPAL, 2009.

A PspA é um importante fator de virulência de *S. pneumoniae* por impedir a ligação do complemento a sua superfície (ROLO et al., 2009). Wu e colaboradores (1997) mostraram que camundongos foram protegidos contra a infecção por *S. pneumoniae* quando imunizados com PspA, via intranasal. Essa proteção foi de 70% dos camundongos imunizados com a proteína comparado aos animais controle onde não houve animais sobreviventes neste experimento. A PspC é importante na adesão e colonização de *S. pneumoniae* e um estudo desenvolvido por Balachandran e colaboradores (2002) mostrou que animais imunizados com PspC foram protegidos contra sepse.

Apesar dessas proteínas, utilizadas separadamente, já terem demonstrado eficácia parcial na proteção em camundongos contra desafio com *S. pneumoniae*, a combinação de

proteínas imunogênicas parece ser uma melhor alternativa para proteção contra o pneumococo. Por exemplo, a combinação entre as proteínas PspA, PspC e Pneumolisina (PdB) foi capaz de oferecer uma proteção melhor quando comparado ao seu potencial de proteção individual (OGUNNIYI et al., 2007).

1.7.1 A proteína Sortase A

Todas as células são estruturadas em compartimentos que cumprem funções biológicas específicas (SCHNEEWIND et al., 1993). Como, por exemplo, as Sortases que são enzimas bacterianas que medeiam a ligação covalente de proteínas de superfície de bactérias Gram-positivas à parede da célula (CHEN et al., 2005).

As sortases são classificadas em diferentes grupos com base em homologia de sequência e o substrato para clivagem. Enzimas Sortases de classe A estão presentes em todas as bactérias Gram-positivas e reconhecem o motivo LPXTG de proteínas de superfície. Enzimas Sortases de classe B reconhecem o motivo NP(Q/K)TN de proteínas que estão envolvidas no transporte do grupo heme. Sortases de classe C reconhecem o motivo (I/L)(P/A)XTG e são específicos de pilina. E as de classe D reconhecem o motivo LPNTA e são expressos em micro-organismos que formam esporos. Além destas classificações, muitas sortases receberam designações que se relacionam com sua ordem de descoberta. (HENDRICKX et al., 2011).

A Sortase A (SrtA) possui um resíduo de cisteína altamente conservado que ataca, nucleofilicamente, a carbonila do resíduo de treonina no motivo LPXTG (leucina, prolina, X, treonina e glicina, onde X é um aminoácido qualquer), hidrolisando a ligação peptídica entre treonina e glicina, criando um complexo proteína-sortase via ligação de tioacilo. A proteína é então transferida pela sortase para o lipídeo II da parede celular. O grupo amina desta molécula ataca então a ligação de tioacilo criando outro complexo, lipídeo II-proteína. Por fim, reações de transglicosilação e transpeptidação que sintetizam a parede celular incorporam esse produto ao peptideoglicano (Figura 6) (CHEN et al., 2005; SPIRIG et al., 2011).

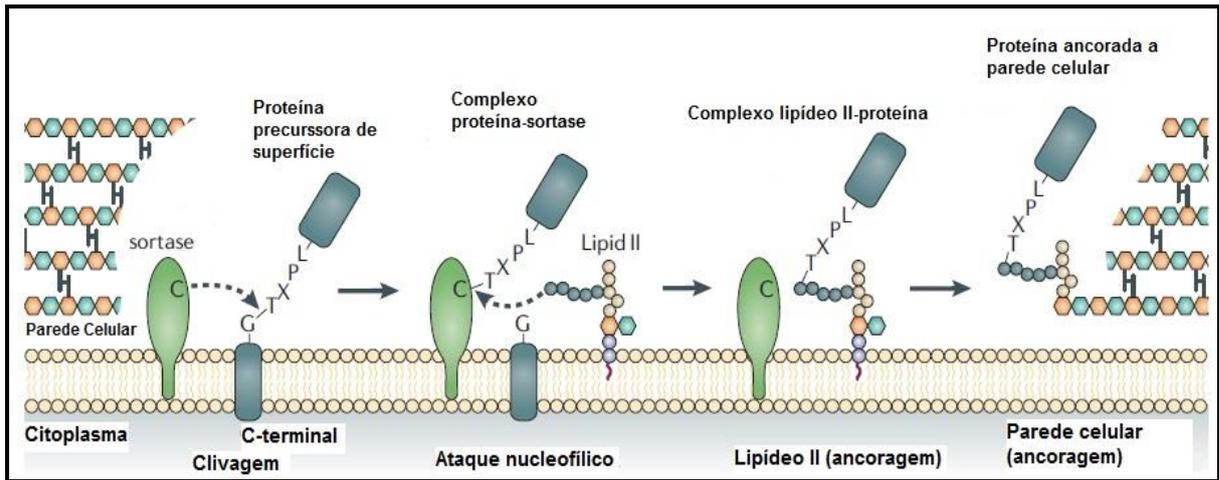


Figura 6: Ancoragem de proteínas de superfície mediada por SrtA.

Fonte: Adaptado de Hendrickx et al., 2011.

A SrtA está associada no processamento de proteínas de superfície de várias bactérias patogênicas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*. (PATERSON & MITCHELL, 2006; SPIRIG et al., 2011). A SrtA possui um importante papel na virulência desses micro-organismos, uma vez que estudos já mostraram que quando SrtA é eliminada, a capacidade de infectar os animais é fortemente reduzida (PATERSON & MITCHELL, 2006; GIANFALDONI et al., 2009). Kharat e Tomasz (2003) demonstraram que a inativação da SrtA no pneumococo resultaram em uma diminuição da aderência em células epiteliais de faringe, *in vitro*. Mazmanian e colaboradores (2000) também demonstraram que *S. aureus*, sem o gene *srtA*, apresentaram deficiência no processamento de proteínas de superfície e, conseqüentemente, deixaram de ancorar proteínas de superfície, levando a uma redução da capacidade destes mutantes em estabelecer a infecção.

Por ser uma proteína conservada e por estar associada ao potencial de virulência de *S. pneumoniae*, a SrtA é uma potencial candidata para ser incluída em uma vacina contra o pneumococo. Um estudo realizado por Gianfaldoni e seus colaboradores (2009) mostrou que camundongos imunizados com esta proteína tiveram proteção contra desafio intraperitoneal com *S. pneumoniae* de diferentes linhagens. Outro estudo desenvolvido por Min e colaboradores (2012) mostrou que a SrtA teve seu potencial de proteção aumentado quando combinada as proteínas glutamyl tRNA sintetase (Gts) e proteína de transporte de poliamina D (PotD) de *S. pneumoniae*, um aumento de 40% de sobrevivência em desafio intranasal. Diante destes resultados, a SrtA é considerada um antígeno promissor para ser incluso em uma vacina contra *S. pneumoniae* formulada com antígenos proteicos.

2 JUSTIFICATIVA

As doenças ocasionadas pela infecção por *S. pneumoniae* são consideradas um problema de saúde pública mundial. Embora existam antibióticos para o tratamento dessas infecções, sabe-se que o índice de bactérias resistentes a essas drogas vem crescendo substancialmente. Sendo assim, a melhor forma de solucionar o problema é através da vacinação. De acordo com Vespa e colaboradores (2009), a partir de dados obtidos entre o período de 2001 e 2006, no Brasil, após a inclusão da vacina pneumocócica PCV-7, houve uma redução de 7% nos casos de otite média, 3% nas pneumonias, 25% nas confirmadas radiologicamente, 65% de sepse, 65% de meningite e 16% das mortes associadas a infecções pelo *S. pneumoniae*.

Porém, mesmo as vacinas existentes, até o momento, apresentarem eficiência significativa, foi demonstrado que o uso da vacina induz redistribuição dos sorotipos não incluídos nas mesmas, com uma tendência de aumento da incidência da doença nos anos subsequentes, através da diminuição da eficiência das vacinas existentes (HUANG et al., 2005). Sendo assim, a busca de uma vacina contra *S. pneumoniae*, baseada em antígenos proteicos conservados, é atraente, pois, além de conferir uma ampla cobertura, uma vacina de tecnologia nacional exigiria um menor dispêndio do governo.

3 OBJETIVO

Identificação e caracterização do potencial imunogênico da proteína SrtA de *S. pneumoniae*.

3.1 Objetivos específicos

- Caracterização, *in silico*, do potencial imunogênico da proteína SrtA de *S. pneumoniae*;
- Produção heteróloga da proteína SrtA;
- Avaliação da resposta imune gerada pela vacinação com a proteína SrtA recombinante em modelo animal.

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização *in silico* da proteína SrtA

4.1.1 Predição de peptídeo sinal e hélice transmembrana

O gene *srtA* de uma linhagem de *S. pneumoniae*, proveniente de um isolado clínico referente ao sorotipo 14, foi utilizado como sequência modelo neste trabalho. A busca das regiões de peptídeo sinal e hélice transmembrana, utilizando a sequência de aminoácidos da SrtA, foi realizada a partir da ferramenta InterProScan 5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>), a qual é uma ferramenta que combina diferentes métodos de reconhecimento de padrões de proteínas e permite a identificação de domínios conservados (QUEVILLON et al., 2005). A predição da topologia da proteína foi realizada utilizando a ferramenta SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) que utiliza uma combinação de redes neurais artificiais treinadas com sequências contendo domínios transmembrana e não contendo estes segmentos (PETERSEN et al., 2011). Além destas, foi utilizada a ferramenta TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), que prevê a localização e orientação de α -hélices que atravessam a membrana de proteínas baseada no modelo de Markov (SONNHAMMER et al., 1998).

4.1.2 Alinhamento de sequências e construção da árvore filogenética

Para avaliar o grau de conservação entre diferentes sequências de SrtA de linhagens distintas de *S. pneumoniae*, foi feito um alinhamento múltiplo entre as sequências, tanto de nucleotídeos quanto de aminoácidos, utilizando a ferramenta ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). As sequências foram obtidas através de consulta ao banco de dados do NCBI – National Center for Biotechnology Information – (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e no SPGDB - *Streptococcus pneumoniae* Genome Database – (<http://pranag.physics.iisc.ernet.in/SPGDB/>). Para avaliar o nível de identidade entre as diferentes linhagens utilizou-se o programa BLAST – Basic Local Alignment Search Tool – (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). A partir do alinhamento pelo ClustalW2, construiu-se uma árvore filogenética com base na sequência do gene *srtA*, a fim de avaliar a classificação evolutiva entre diferentes linhagens de *S. pneumoniae* em relação ao gene.

Avaliou-se também o nível de identidade entre a proteína SrtA de *S. pneumoniae* e proteínas SrtA de diferentes bactérias Gram-positivas, sendo elas: *S. agalactiae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *L. monocytogenes*. Para esta finalidade, as sequências

das SrtAs foram alinhadas separadamente com a SrtA de *S. pneumoniae* sorotipo 14 utilizando a ferramenta ClustalW2 e o nível de identidade foi avaliado pelo BLAST.

4.1.3 Predição de epítomos

Para identificar porções antigênicas das proteínas com base na busca por epítomos de células B, utilizou-se a plataforma IEDB – Immune Epitope Database and Analysis Resource - (<http://www.iedb.org/>). A predição foi realizada levando em consideração a localização de epítomos lineares, a hidrofobicidade e a acessibilidade dos epítomos.

Para a predição de epítomos para HLA de classe II adotou-se o *Web-software* NetMHCII 2.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>) que prediz o potencial de ligação de peptídeos a alelos HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP e alelos de MCH de classe II de camundongo. Todos os possíveis peptídeos de 15-*mer* dentro de uma sequência de aminoácidos recebem uma classificação baseada na afinidade de ligação do peptídeo de 15-*mer* aos alelos de HLA. Os peptídeos podem ser classificados em peptídeos de forte ligação, baixa ligação ou não receberam classificação por não terem atingido o *score* de ligação (NIELSEN & LUND, 2009).

4.2 Produção heteróloga da proteína SrtA

4.2.1 Extração do DNA genômico de *S. pneumoniae*

O DNA genômico de *S. pneumoniae*, referente ao sorotipo 14, foi fornecido pelo Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas (SDBF) da Diretoria do Instituto Octávio Magalhães na FUNED. A linhagem foi isolada a partir de amostras clínicas positivas para meningite recebidas pelo SDBF e foram cultivadas em meio de cultivo ágar sangue. Após a semeadura, as placas foram incubadas à temperatura de 35°C +/- 1°C, na presença de 5 a 10% de CO₂, por um período de 24 a 38 horas. O DNA genômico de *S. pneumoniae* foi extraído utilizando o kit comercial Bacteria Genomicprep Mini Spin Kit (GE Healthcare) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA foi armazenado a -20°C até o uso.

4.2.2 Amplificação da ORF codificadora da proteína SrtA por PCR

Iniciadores específicos foram desenhados para a ORF (*srtA*) que codifica a proteína SrtA, baseando-se na sequência disponível no NCBI. Foram incluídos sítios de restrição para o reconhecimento das enzimas *XhoI* e *NdeI* para futura clonagem no vetor pET-21a. Os iniciadores foram desenhados de maneira a criar uma deleção na região N-terminal da SrtA em 30 aminoácidos. As sequências dos iniciadores utilizados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências dos iniciadores

INICIADORES	
Forward -30aa	5' CTCCTCATATGTTGATTTTTTAATACTCAAATTCG 3'
Reverse Completo	5' CCCCCTCGAGATAAAATTGTTTATATGGTTGA 3'

A ORF de interesse foi amplificada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando reagentes da marca Thermo Scientific. As reações foram realizadas nas condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Protocolo experimental para a PCR

Reagentes para PCR		
Reagente	Concentração	Volume
PCR Master Mix	2X	12,5 µL
Iniciador Forward	5 pmol/µL	1,0 µL
Iniciador Reverse	5 pmol/µL	1,0 µL
DNA genômico	67,8 µg/mL	2,0 µL
Água Milli-Q autoclavada	-	8,5 µL
Volume total	-	25 µL

As reações foram realizadas com 35 ciclos, precedidos por um período de 4 minutos a 94°C. Cada ciclo foi composto por 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 52°C e 60 segundos de extensão a 72°C. Ao final dos 35 ciclos, a temperatura foi mantida a 72°C por um período de 5 minutos e posteriormente, reduzida a 4°C. O termociclador utilizado foi o GeneAmp Thermal Cycler 9700 (AppliedBiosystems). O produto de PCR foi resolvido em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

4.2.3 Clonagem da ORF *srtA*

Para iniciar a etapa de clonagem, foi realizada uma purificação do produto de PCR usando um protocolo de precipitação com glicogênio. Para cada 30 µL do produto foram adicionados 2 µL de acetato de amônia (7,5 M), 2 µL de glicogênio (20 mg/mL) e 30 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos contendo a amostra foram homogeneizados com pipeta e incubados em gelo durante 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 16.430 g a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado, cuidadosamente. Acrescentou-se 200 µL de etanol 70% gelado e as amostras foram centrifugadas a 16.430 g a 4°C por 10 minutos. O

sobrenadante foi descartado, cuidadosamente, e o precipitado incubado a 37°C durante 30 minutos para evaporação completa do etanol.

4.2.3.1 Digestão, desfosforilação e reação de ligação

A ORF de interesse purificada foi clonada no vetor pET-21a (Figura 7). A escolha desse vetor foi baseada em algumas de suas propriedades importantes, como presença de uma cauda de histidina, que facilita tanto a purificação quanto o seu reconhecimento nos ensaios de Western Blot e a presença do operador *lac* com seu sistema de indução por IPTG (β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo), um indutor de transcrição genética.

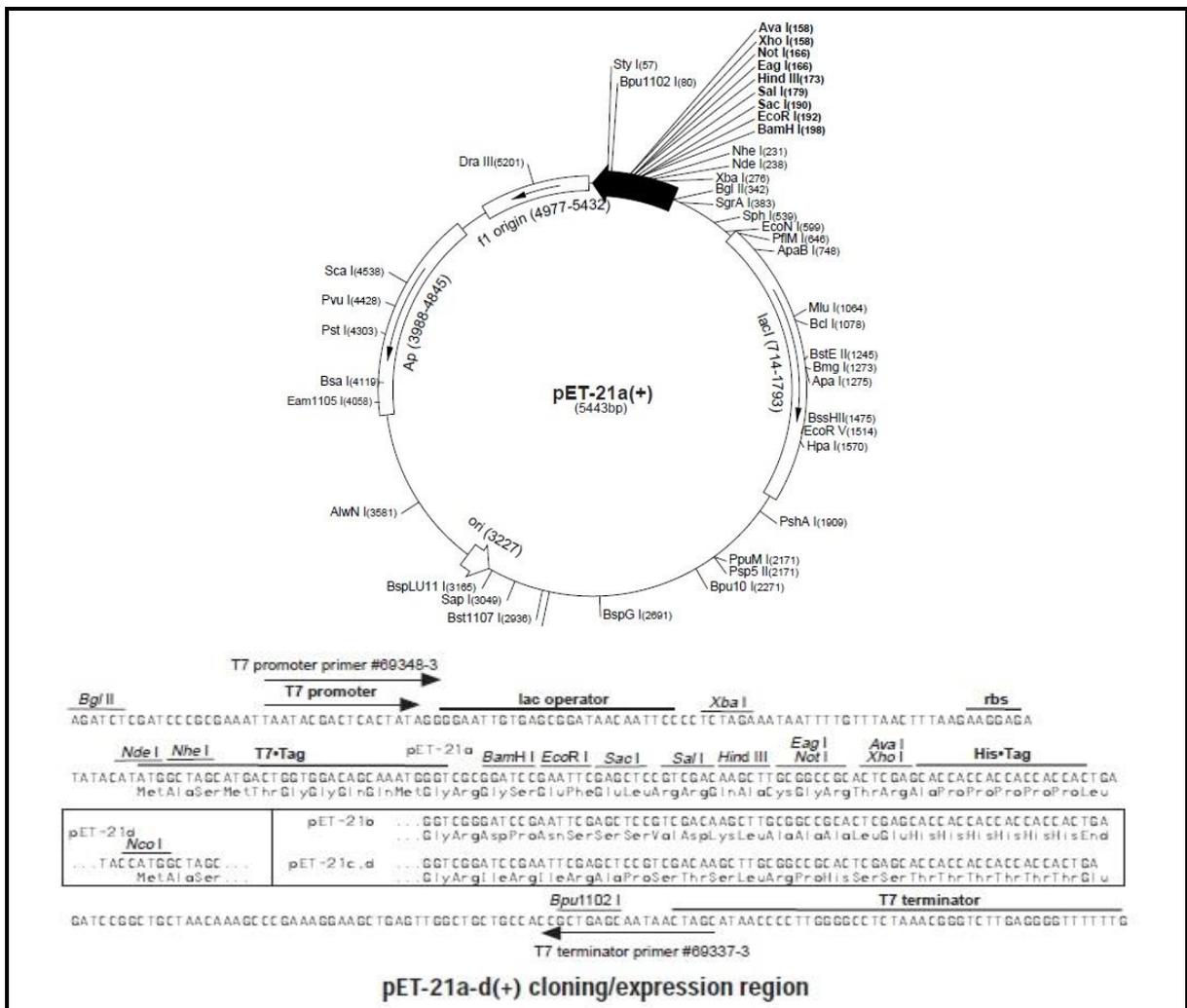


Figura 7: Mapa do vetor pET-21a. Representação esquemática do vetor pET-21a evidenciando o promotor T7, o operador *lac*, sítios de reconhecimento por diferentes enzimas de restrição e cauda de histidina.

Fonte: Novagen, 1998.

A clivagem pelas enzimas de restrição tanto para o gene *srtA* quanto para o plasmídeo foi realizada utilizando 1 µg de DNA, conforme protocolo recomendado pela Thermo Scientific. Para a primeira digestão, utilizou-se a enzima *NdeI*. As amostras foram submetidas a banho maria a 37°C por 3 horas. Após incubação, os dois produtos foram submetidos a uma purificação utilizando o protocolo de precipitação com glicogênio e, após, foram submetidos à segunda digestão com a enzima *XhoI*, seguindo as mesmas condições da primeira digestão. Após cada digestão, a qualidade do produto foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

A seguir, o plasmídeo foi submetido a uma etapa de desfosforilação com a enzima *Shrimp Alkaline Phosphatase* – SAP seguindo o protocolo recomendado pela Fermentas, utilizando 0,5 µg do plasmídeo pET-21a. Incubou-se a 37°C em banho maria por 1 hora para ação da enzima, seguida de incubação por 15 minutos em banho maria a 65°C para inativar a enzima. Após, vetor e o inserto foram ligados em uma proporção de 1:3 seguindo protocolo recomendado pela Promega, fornecedora da enzima T4 DNA ligase, com incubação a 16°C por 16 horas. Foram utilizados controles negativos, nos quais água foi adicionada em substituição ao DNA.

4.2.3.2 Preparo de células *Escherichia coli* NM522 quimiocompetentes

Uma pré-cultura foi preparada contendo 10 µL de *E. coli* da linhagem NM522 em 5 mL de meio de cultura LB (Lennox, BioAmerica) e incubada a 37°C por 16 horas sob agitação. Uma alíquota de 200 µL dessa pré-cultura foi inoculada em 20 mL de meio LB, incubada com agitação a 37°C por, aproximadamente, 2 horas até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) entre 0,4 e 0,7. O meio de cultura contendo as bactérias foi centrifugado a 870 g por 10 minutos a 4°C. Logo depois, o sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspensionado em 20 mL de CaCl₂ (50 mM) gelado e incubado por 20 minutos em banho de gelo. A suspensão foi centrifugada a 870 g por 10 minutos a 4°C e precipitado ressuspensionado em 2 mL de CaCl₂ (50 mM) gelado. As bactérias quimiocompetentes foram mantidas em banho de gelo por 1 hora até serem utilizadas na transformação.

4.2.3.3 Transformação bacteriana utilizando células *E. coli* NM522 quimiocompetentes

Para a transformação bacteriana com a técnica de choque térmico, foram utilizadas células *E. coli* NM522 quimiocompetentes. Para cada ligação, a transformação foi realizada conforme seguinte protocolo: 5 µL do produto de ligação foi adicionado em 100 µL de células quimiocompetentes e incubou-se em banho de gelo durante 30 minutos. Após, aqueceu-se os tubos em banho maria a 42°C por 90 segundos e logo submeteu-se os tubos em banho de

gelo por 2 minutos. Acrescentou-se em cada tubo 500 µL de meio LB para cultivo durante 1 hora a 37°C sob agitação. Após este período, 100 µL da transformação com a ligação do vetor pET-21a (pET-21a/*srtA*) foi semeada em meio LB ágar (Lennox, BioAmerica), suplementado com ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Células quimiocompetentes plaqueadas sem a transformação com o plasmídeo foram utilizadas como controle negativo e células quimiocompetentes transformadas com o plasmídeo, sem inserto, foram utilizadas como controle positivo.

4.2.3.4 PCR de colônias para seleção de clones positivos

Com o objetivo de selecionar clones positivos, algumas colônias foram selecionadas, aleatoriamente e submetidas a uma PCR. A técnica foi realizada seguindo o seguinte protocolo: cada colônia selecionada foi inoculada em um tubo contendo 40 µL de solução de lise bacteriana (Tris-HCl 20 mM pH 8,5; EDTA 2 mM; Triton x-100 1%). Os tubos foram então submetidos a um banho maria a 62°C durante 2 minutos e após os tubos foram submetidos a uma centrifugação de 3.600 g durante 5 minutos. Desta forma, utilizou-se como molde para amplificação 5 µL do lisado seguindo as condições já mencionadas no item 4.2.2. As reações foram realizadas com 35 ciclos, precedidos por um período de 4 minutos a 94°C conforme descrito anteriormente.

O produto de PCR foi visualizado em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Cada colônia positiva foi submetida a um processo de extração do plasmídeo contendo o gene de interesse utilizando o kit MiniPrep da Axygen Biosciences. A construção pET-21a/*srtA* foi conservada a -20°C.

4.2.4 Reação de sequenciamento

A partir da extração do DNA plasmideano, realizada anteriormente, foi feito um sequenciamento automático baseado no método didesoxi, utilizando uma marcação fluorescente para cada ddNTP (dideoxynucleotídeos). A reação de sequenciamento foi realizada com o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit utilizando o sequenciador automático Abi31-30 da Applied Biosystems seguindo as recomendações do fabricante. Na reação foram utilizados os iniciadores *T7 promoter* e *T7 terminator* para o vetor pET-21a (Tabela 3).

Tabela 3: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento

INICIADORES	
Senso: <i>T7 Promoter</i>	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
Anti-Senso: <i>T7 Terminator</i>	5' TATGCTAGTTATTGCTCAG 3'

4.2.5 Transformação da *E. coli Rosetta gami* com o vetor pET-21a/srtA e expressão da proteína SrtA

O vetor pET-21a/srtA foi transformado em *E. coli Rosetta gamiTM B (DE3) pLysS* quimiocompetente conforme preparo mencionado nos itens 4.2.3.2 e 4.2.3.3, e 100 µL da transformação com pET-21a/srtA foi semeada em meio LB ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e 34 µg/mL de cloranfenicol. A importância da escolha dessa linhagem está relacionada por esta possuir tRNAs para códons raramente usados por *E. coli* e possuir mutações nos genes *trxB* e *gor* que facilitam o enovelamento da proteína. Algumas colônias transformadas foram selecionadas, aleatoriamente, e submetidas a uma PCR de colônia para confirmação da presença do vetor pET-21a contendo a ORF *srtA*, conforme protocolo anteriormente descrito no item 4.2.2.

Após confirmação do clone realizou-se a indução da expressão da ORF SrtA. Fez-se uma pré-cultura com uma colônia de interesse em meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Após 16 horas, uma alíquota da pré-cultura foi transferida para tubo contendo meio LB, proporção 1:50, suplementado com ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). Aguardou-se atingir uma DO₆₀₀ de 0,4 a 0,6. A expressão da ORF *srtA* recombinante se deu através da indução por IPTG (Figura 8). Após atingir a DO desejada, retirou-se uma alíquota de 1mL do tubo, identificando-a como T₀ (tempo zero), e adicionou-se IPTG (1 mM) ao restante da cultura. Alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada hora de expressão (durante 3 horas) visando à avaliação da cinética de expressão, e foram identificadas como T₁, T₂ e T₃. Ao final da expressão a cultura restante foi centrifugada a 1.500 g durante 10 minutos a 25°C.

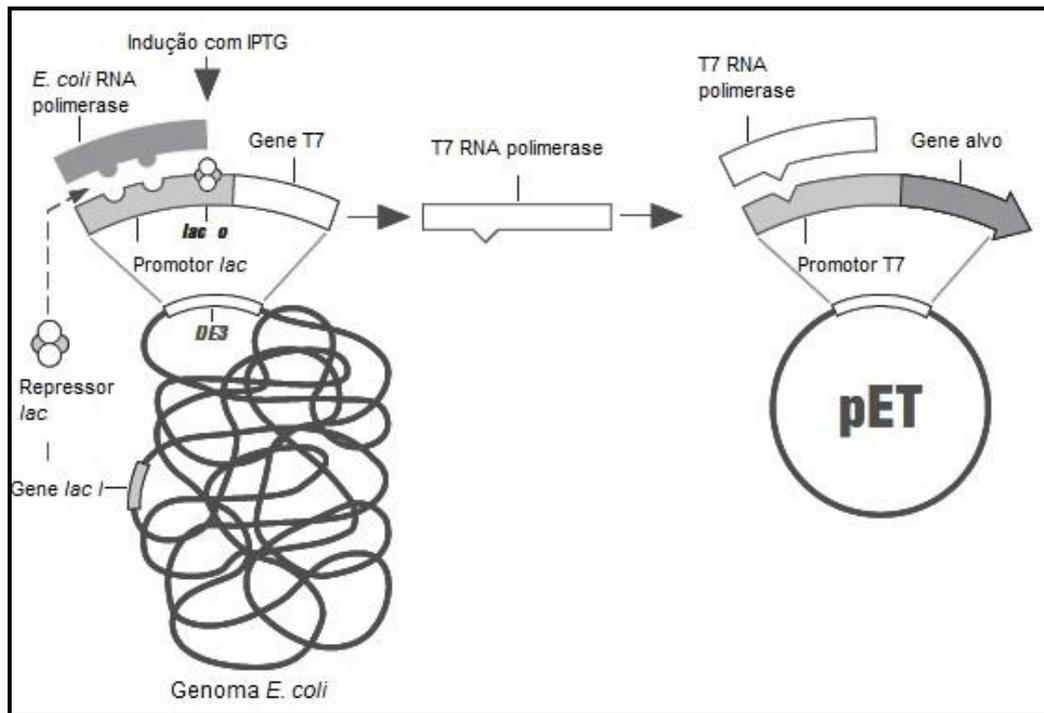


Figura 8: Esquema do sistema de indução de expressão por IPTG
 Fonte: Adaptado de Novagen, 2003

As alíquotas que foram retiradas a cada hora após a indução foram resuspendidas em 60 μ L de Tampão de Amostra 2X com Redução (Tampão Tris-HCl 125 mM pH 6,8; Glicerol 20%; SDS 4%; Azul de Bromofenol 0,004%; β -mercaptoetanol 10%) para análise da cinética de expressão em gel de poliacrilamida 15%. O precipitado decorrente da centrifugação, após a expressão, foi submetido a uma solubilização, onde o mesmo foi ressuspendido em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 2 mM), na proporção 1:10, e submetido a um banho de gelo por 15 minutos. A seguir, sonicou-se a amostra durante 30 segundos, com intervalo de repouso de 30 segundos a cada sonicação, por 3 vezes. Após a sonicação, centrifugou-se a amostra a 17.400 g a 4°C por 15 minutos. Retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspendido com o mesmo volume em PBS 0,1 M e ambos foram armazenados a -20°C. Alíquotas de cada produto solubilizado foram retiradas e homogeneizadas também com Tampão de Amostra 2X com Redução para avaliação da solubilidade da proteína em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, tensão de 220 V, corrente de 250 mA, potência de 120 W) e corado com Azul de Coomassie.

4.2.6 Purificação da proteína SrtA recombinante

A proteína SrtA recombinante foi purificada por meio de cromatografia líquida de afinidade utilizando o aparelho AKTA Purifier (GE). A coluna utilizada foi do tipo His Trap™ FF crude 1 mL e, como ligante, foi utilizado sulfato de níquel (0,1 M), que forma um complexo

com a cauda de histidina. Para ser aplicada na coluna, a amostra de proteínas solubilizadas foi centrifugada a 23.700 g por 10 minutos e diluída 1 vez em Tampão Start 20 mM de Imidazol (Imidazol 20 mM; Na₂HPO₄ 3,2 mM; NaH₂PO₄ 3,2 mM; NaCl 160 mM, pH 7,4). A amostra foi eluída em um gradiente de imidazol com Tampão de Eluição 500 mM de Imidazol (Imidazol 500 mM; Na₂HPO₄ 3,2 mM; NaH₂PO₄ 3,2 mM; NaCl 160 mM, pH 7,4) que compete com a cauda de histidina pelo sulfato de níquel. Ao longo da cromatografia foram coletadas frações de 1 mL, sendo que, as frações referentes ao pico de eluição foram concentradas no SpeedVac Concentrator Plus (Eppendorf) e armazenadas a -20°C. Os tubos contendo a proteína purificada foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE, tensão de 220 V, corrente de 250 mA, potência de 120 W) e corado com Azul de Coomassie.

4.2.7 Western blot para confirmação da presença da cauda de histidina e da imunogenicidade da proteína recombinante SrtA

Alíquotas da proteína SrtA recombinante expressa (T₃) ou purificada foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE, tensão de 220 V, corrente de 250 mA, potência de 120 W). Após, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose a uma tensão de 110 V, corrente de 400 mA, potência de 50 W durante uma hora, utilizando o tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM pH 8,3; Glicina 192 mM; Metanol 20%).

Concluída a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio (leite em pó) 1:100 (0,5 g em 50 mL de PBS Tween 20 0,01%). Após 1 hora, a membrana foi lavada durante 10 minutos em agitação com PBS Tween 20 0,05%. Em seguida, a membrana foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora sob agitação com a solução de anticorpo primário, específica para cada análise (anti-HIS 1:3.000 da GE ou soro hiperimune de coelho imunizado com proteína recombinante SrtA 1:1.000). Depois de incubada com os anticorpos específicos, a membrana foi lavada novamente com PBS Tween 20 0,05% durante 10 minutos e incubada com o conjugado (Proteína A-peroxidase 1:10.000), durante 1 hora sob agitação. A membrana foi lavada novamente com PBS Tween 20 0,05% durante 10 minutos e adicionou-se o substrato (10 mg DAB; 20 mL Tris-HCl 0,05 M pH 8; 5 µL H₂O₂), deixou-se em agitação sob ausência de luz até o aparecimento de bandas. A reação foi interrompida pela adição de água destilada.

4.3 Avaliação do potencial imunogênico da proteína SrtA recombinante

O protocolo de utilização de camundongos Swiss Webster foi submetido ao comitê de ética em pesquisa animal (CEUA) da FUNED e aprovado sob protocolo 060/2013. A cópia da folha de aprovação encontra-se no Anexo 1.

4.3.1 Imunização dos camundongos e avaliação da resposta humoral

Após a purificação da proteína SrtA recombinante, 40 camundongos Swiss Webster fêmeas de 18-22 g foram utilizados para avaliar a resposta humoral induzida pela imunização com a proteína SrtA. Os animais foram separados em dois grupos, sendo 20 animais pertencentes ao grupo controle (não vacinado) e 20 imunizados com a proteína SrtA recombinante. Animais do grupo imunizado receberam 30 µg da proteína SrtA purificada associada a adjuvante de Freund da Sigma (na proporção 1:1), e os animais do grupo controle receberam tampão PBS 0,1 M com adjuvante de Freund (1:1), ambos via intraperitoneal. Utilizou-se adjuvante de Freund completo na primeira imunização e incompleto nas imunizações subsequentes. Foram três imunizações nos dias 0, 14 e 28. Uma semana após a última imunização, aproximadamente, 500 µL de sangue dos animais foi coletado via caudal.

Os níveis de anticorpos presentes no soro foram avaliados por meio da técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*). Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 2,5 µg/mL da proteína SrtA recombinante em tampão de sensibilização (Na_2CO_3 1,59 g/L; NaHCO_3 2,93 g/L; pH 9,6) a 37°C por 2 horas. Cada placa foi lavada 2x com solução de lavagem (NaCl 9,0 g/L; Tween 20 a 0,05%) e bloqueada com leite em pó 1% em tampão PBS 0,1 M Tween 20 0,1% a 37°C por 1 hora. Em seguida as placas foram lavadas novamente e incubadas com o soro dos camundongos diluído 1:250 em tampão PBS 0,1 M Tween 20 0,1% a 37°C por 1 hora e, após, cada placa foi lavada 4x. Para a determinação dos níveis de IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2a, as placas foram incubadas com o conjugado apropriado para cada análise (Proteína A-peroxidase 1:10.000; IgG1-peroxidase 1:5.000 e IgG2a-peroxidase 1:3.000) a 37°C por 1 hora. Em seguida foram lavadas novamente e incubadas com tampão citrato (OPD 5 mg/L; H_2O_2 0,4 mM; Na_2HPO_4 7,19 g/L; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 5,19 g/L pH 5,0) à temperatura ambiente, sob ausência de luz, por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 30 µL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1:20, em cada poço. A leitura da absorbância foi realizada em leitor ELISA no comprimento de onda de 492 nm.

4.3.2 Determinação da DL₅₀ para desafio intranasal

A DL₅₀ é uma forma de expressar o grau de toxicidade aguda de um produto. Indica a quantidade necessária de bactérias para matar 50% dos animais testados. Para testar o potencial multivalente da SrtA para outros sorotipos de *S. pneumoniae*, foi utilizado para os ensaios em animais um isolado clínico do pneumococo referente ao sorotipo 4.

Uma alíquota de *S. pneumoniae* sorotipo 4 foi semeada em uma placa de Petri contendo meio ágar sangue 5%. O crescimento ocorreu por 16 h, em temperatura de 35°C +/- 1°C, na presença de 5 a 10% de CO₂. Após esse período várias colônias provenientes da placa foram inoculadas em 10 mL de meio Todd Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura até atingir uma DO₆₀₀ de 0,1. Este inóculo permaneceu incubado na estufa por, aproximadamente, três horas até atingir uma DO₆₀₀ de 0,4. O meio contendo as bactérias foi centrifugado a 380 g durante 20 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou 10 mL de salina 0,9% estéril. Centrifugou-se, novamente, nas mesmas condições e o sobrenadante foi descartado. O precipitado de bactérias foi ressuscitado em 1 mL de salina 0,9% estéril e usado para o preparo de diferentes concentrações para desafio.

Para o ensaio de desafio, 24 camundongos Swiss Webster de 25-27 g foram submetidos a diferentes concentrações de inóculo para a determinação da DL₅₀ para desafio intranasal. Os animais foram divididos em três grupos, com oito camundongos cada, e as concentrações de inóculo testadas foram 10³, 10⁴ e 10⁵ UFC/animal. Após o preparo das bactérias e do inóculo para infecção, os camundongos foram anestesiados com isoflurano utilizando um vaporizador com indução de até 3% com oxigênio. Cada animal recebeu 40 µL de suspensão bacteriana com o auxílio de uma pipeta via intranasal. A letalidade dos animais foi acompanhada durante 10 dias.

4.3.3 Avaliação da resposta inflamatória

Três grupos de camundongos Swiss Webster de 18-22 g, com seis animais cada, foram imunizados conforme protocolo descrito anteriormente no item 4.3.1. Dois grupos receberam 30 µg de SrtA recombinante e o outro recebeu PBS 0,1 M, associados a adjuvante de Freund. Duas semanas após a última imunização o grupo controle não imunizado (Sp) e um grupo imunizado (Sp+SrtA) foram desafiados via intranasal com 2x10⁵ UFC/animal (20xDL₅₀). O outro grupo imunizado (SrtA) não foi infectado. Aguardou-se 24 h após infecção e os animais de todos os grupos foram eutanasiados e submetidos ao lavado broncoalveolar (BAL).

Para realização do BAL, primeiramente os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma dose de quetamina/xilasina/PBS 0,1 M, na proporção de 3:1:4. O

BAL foi realizado com o auxílio de uma cânula injetando 1 mL de PBS 0,1 M nos pulmões por 3x. O volume recuperado foi reservado em um tubo e repetiu-se o procedimento com mais 1 mL de PBS 0,1 M. Ao final todo o volume recuperado do lavado foi reservado em um tubo eppendorf de 2 mL. Os tubos contendo o BAL de cada animal foram centrifugados a 310 g por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi armazenado a -20°C e o precipitado de células foi ressuspenso em 100 µL de PBS/BSA 3%. Foi feita uma diluição de 1:10 das células em reagente de Turk para a contagem total de células em câmara de Neubauer. A partir da quantidade de células contadas, foi feito um “citospin” com 40.000 células em uma centrifugação a 450 rpm por 5 minutos. As lâminas foram coradas utilizando o Panótico Kit Rápido para a contagem diferencial de células.

4.3.4 Desafio intranasal e intraperitoneal

Camundongos imunizados conforme já descrito no item 4.3.1 foram desafiados via intranasal ou via intraperitoneal para avaliar o potencial protetor da proteína SrtA recombinante. Para o desafio intranasal, 10 animais do grupo controle não imunizado (Ctrl) e 10 animais imunizados com a SrtA recombinante foram desafiados com 5×10^4 UFC/animal ($5 \times DL_{50}$), 7 dias após a última imunização, conforme processo já descrito anteriormente no item 4.3.2. Após o inóculo, os animais foram acompanhados durante o período de 14 dias.

Para o desafio intraperitoneal, 20 animais do grupo controle não imunizado (Ctrl) e 20 animais imunizados com a SrtA recombinante foram desafiados com 2×10^4 UFC/animal ($20 \times DL_{50}$), 7 dias após a última imunização. A utilização da DL_{50} para esta via foi determinada em estudos prévios por Araújo e colaboradores (2012). Após o inóculo, o acompanhamento da letalidade dos animais ocorreu durante 14 dias.

4.3.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism 6 que combina ferramentas de análises de gráficos científicos, ajuste de curva, estatísticas compreensíveis e organização de dados. As análises de anticorpos foram realizadas por teste t de Student, sendo consideradas uma diferença estatística com valor de $P < 0,05$. As análises de células foram realizadas pelo método de múltipla variância (ANOVA) com pós teste de Newman-Keuls sendo considerado uma diferença estatística com valor de $P < 0,05$. E as análises estatísticas para os ensaios de letalidade foram realizadas pelo teste de Log-rank e foi considerada uma diferença estatística com valor de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão divididos em análises *in silico* da proteína SrtA de *S. pneumoniae* e subsequentemente serão apresentados os resultados referentes aos ensaios experimentais.

5.1 Caracterização *in silico* da SrtA

5.1.1 Predição de peptídeo sinal e hélice transmembrana

Conforme já mencionado anteriormente, a SrtA é uma proteína ancorada na membrana celular de bactérias Gram-positivas. Desta forma, com o objetivo de se avaliar, *in silico*, a estrutura da SrtA de *S. pneumoniae*, foram realizadas análises para a caracterização de domínios transmembrânicos, bem como presença de peptídeo sinal.

A predição da presença de peptídeo sinal e hélice transmembrana em SrtA foi realizada através dos *Web-sofwares* InterProScan 5 (Figura 9), SignalP 4.1 (Figura 10) e TMHMM 2.0 (Figura 11).

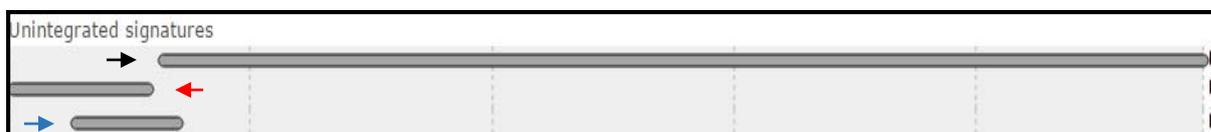


Figura 9: Representação esquemática da estrutura da proteína SrtA de *S. pneumoniae*. A seta preta indica a região não citoplasmática da SrtA, a vermelha indica a região correspondente ao peptídeo sinal enquanto a azul indica região de hélice transmembrana. Análise realizada através da ferramenta InterProScan 5 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/>).

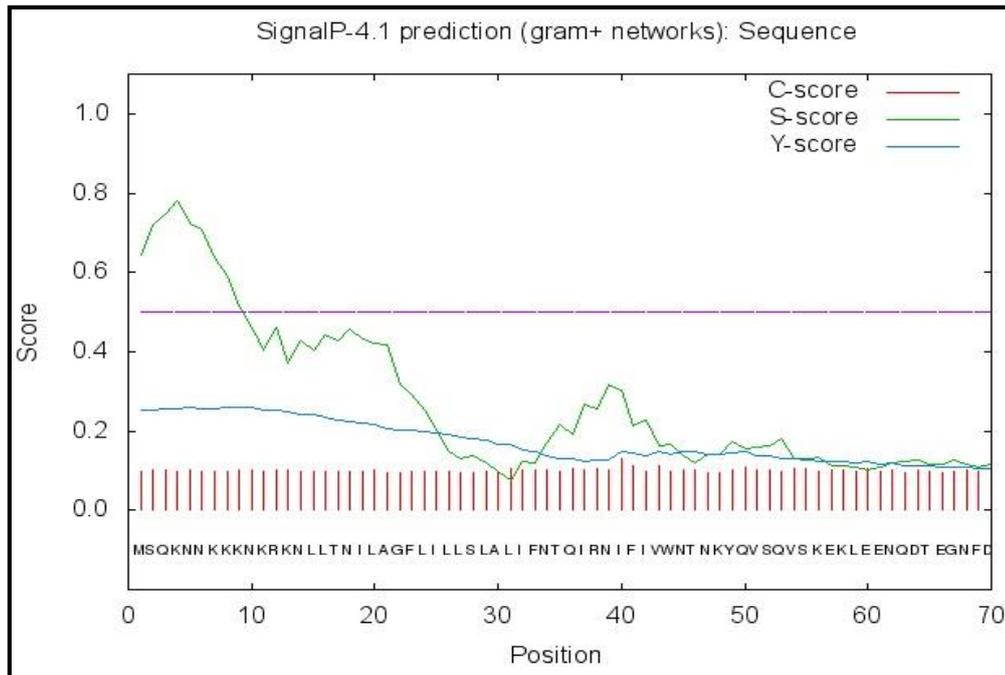


Figura 10: Predição de peptídeo sinal da proteína SrtA. O resultado é apresentado a partir de três diferentes scores: C, S e Y. O C-score distingue o sítio de clivagem de peptídeo sinal. O S-score distingue posições que estão contidas no peptídeo sinal das que estão na porção madura da proteína, sendo que o S-score de 0.5 foi definido como *cutoff* para classificação dos resíduos como fazendo parte da sequência de um peptídeo sinal. Enquanto que o Y-score é uma média geométrica dos dois scores anteriores. Análise realizada através da ferramenta SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

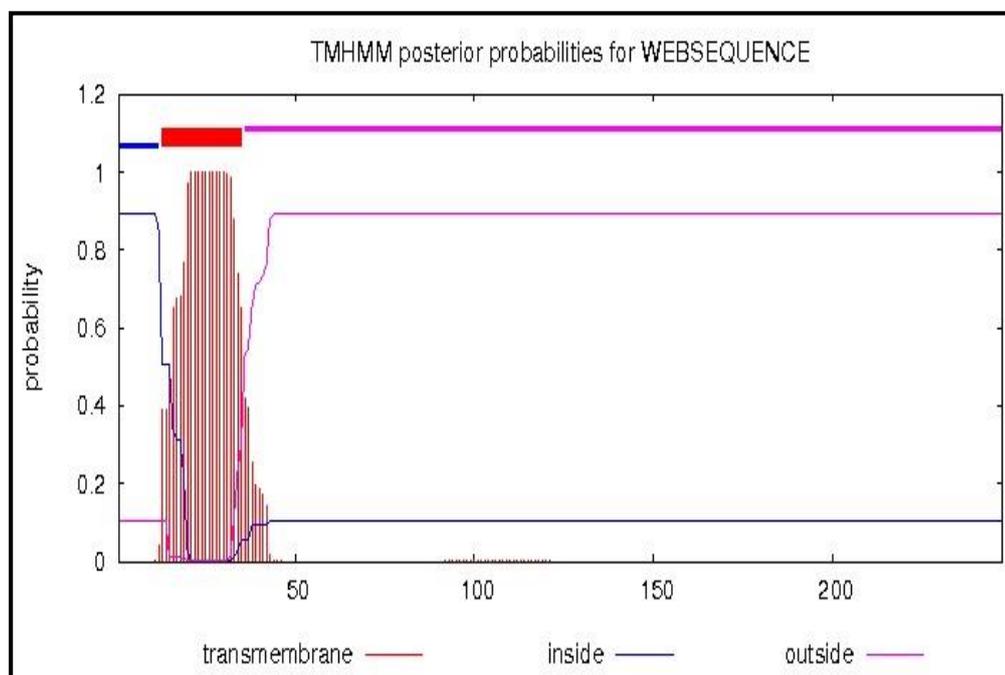


Figura 11: Predição do domínio transmembrana da proteína SrtA. A região destacada em azul corresponde a porção citoplasmática de SrtA, em vermelho a hélice transmembrana e rosa a porção extra citoplasmática. Análise realizada através da ferramenta TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>).

As análises utilizando os três algoritmos distintos demonstraram que a proteína SrtA de *S. pneumoniae* apresenta um peptídeo sinal em sua sequência representado pelos resíduos de aminoácidos que se encontram acima do *cutoff* de 0.5 (*S-score*) e que se estende do aminoácido Metionina (1) até o resíduo Asparagina (10) (Figura 10). Este peptídeo sinal direciona a SrtA para a membrana plasmática do *S. pneumoniae*. Além disto, foi identificado também a presença de uma hélice transmembrana, após peptídeo sinal identificada pela cor vermelha (Figura 11), entre os aminoácidos Lisina (13) até o resíduo Treonina (35) responsável pelo ancoramento da SrtA na membrana plasmática.

Estes resultados corroboram com os resultados descritos na literatura por Bierne e colaboradores (2002) e Dramsi e colaboradores (2005), os quais demonstraram que a SrtA das bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *S. gordonii*, *L. monocytogenes*, *B. anthracis*, *S. pyogenes* e *E. faecalis* possuem em sua região N-terminal peptídeo sinal e domínio transmembrana. As regiões preditas para estas bactérias foram semelhantes a predição realizada para SrtA de *S. pneumoniae*.

5.1.2 Alinhamento de sequências de SrtA e construção da árvore filogenética

O grau de conservação da proteína SrtA em diferentes linhagens de *S. pneumoniae* foi avaliado através do alinhamento de sequências e árvore filogenética. Para isso, as sequências, tanto de nucleotídeos quanto de aminoácidos, foram obtidas através de consulta ao banco de dados GenBank do NCBI e ao SPGDB. As sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalW2 e os alinhamentos encontram-se no Anexo 2 deste trabalho.

A partir do alinhamento das sequências, observou-se que a SrtA é altamente conservada entre as diferentes linhagens de *S. pneumoniae* analisadas, sendo elas: ATCC 700669, D39, TCH8431/19A, R6, SPN994039, SPN994038, SPN034183, SPN034156, OXC141, SPNA45, INV200, INV104, gamPNI0373, AP200, G54, 670-6B, TAIWAN19F-14, 70585, P1031, JJA, HUNGARY19A-6 e A026. Estas linhagens são pertencentes a diferentes sorotipos, sendo eles 1 (INV104 e P1031), 2 (D39 e R6), 3 (SPN994039, SPN994038, SPN034183, SPN034156, SPNA45 e OXC141), 5 (70585), 6B (670-6B), 11A (AP200), 14 (JJA e INV200), 19A (TCH8431/19A e HUNGARY19A-6), 19F (G54, TAIWAN19F-14 e A026) e 23F (ATCC 700669). Além disso, observou-se 99% de identidade entre as sequências quando analisadas através do algoritmo BLASTn e BLASTp. Estes resultados corroboram os dados obtidos por Paterson e Michtell (2006) que demonstraram o alto grau de conservação de *srtA* após sequenciar 20 isolados diferentes de *S. pneumoniae*. Estas observações quanto a conservação de sequência sugerem que a SrtA possui um papel biológico importante em *S. pneumoniae*, o que pode estar relacionado a sua função na ancoragem de proteínas à parede celular. Estudos mostram que cerca de 17 proteínas pneumocócicas são ancoradas pelo

motivo LPXTG, embora estes números possam variar de acordo com cada linhagem (MITCHELL & MITCHELL, 2010).

Em paralelo às análises realizadas com linhagens pneumocócicas, avaliamos também o nível de identidade da SrtA de *S. pneumoniae* com as SrtAs de outras bactérias Gram-positivas patogênicas. O objetivo desta busca foi avaliar se a SrtA poderia ser usada para o desenvolvimento de uma vacina multivalente que fosse capaz de imunizar contra *S. pneumoniae* e outras bactérias Gram-positivas. Nossos resultados demonstraram que a identidade entre SrtA de *S. pneumoniae* e bactérias do mesmo gênero como *S. agalactiae* (53%), *S. pyogenes* (56%) e *S. mutans* (59%), foi maior que quando comparado a bactérias pertencentes a outros gêneros tais como *S. aureus* (25%), *S. epidermidis* (33%) e *L. monocytogenes* (35%). Os alinhamentos referentes a estas análises se encontram no Anexo 3 deste trabalho. Estas análises sugerem que, apesar de existir um certo grau de conservação entre bactérias pertencentes ao mesmo gênero (*Streptococcus*), a sequência se apresentou muito variável. Desta forma, para avaliar o potencial da SrtA como uma vacina multivalente para bactérias de outras espécies seria necessário analisar o grau de conservação entre os potenciais epítomos da SrtA de *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *S. pyogenes* e *S. mutans*. Anderson e colaboradores (2012) demonstraram que a proteína de transporte de manganês C (MntC), conservada em todo grupo de espécies de Estafilococos, foi eficaz em reduzir a carga bacteriana em infecção por *S. aureus* e *S. epidermidis* em camundongos imunizados com MntC. Outro estudo mais recente demonstrou que amidase Maior (Atl-AM), proteína de Estafilococos associada a parede celular, apresentou um alto potencial imunogênico e protetor em camundongos desafiados com *S. aureus* ou *S. epidermidis* (NAIR et al., 2015). Estes estudos demonstram a possibilidade de utilização de algumas proteínas conservadas entre bactérias de diferentes espécies com potencial de desencadear proteção.

A partir da sequência nucleotídica de *srtA* das linhagens de *S. pneumoniae* analisadas, foi construída uma árvore filogenética com o objetivo de avaliar como as linhagens pneumocócicas se distribuem evolutivamente com base no gene *srtA*, e além disso, se os sorotipos referentes a estas linhagens estão relacionados com a distribuição nos clados. A árvore foi gerada utilizando o programa ClustalW2 (Figura 12).

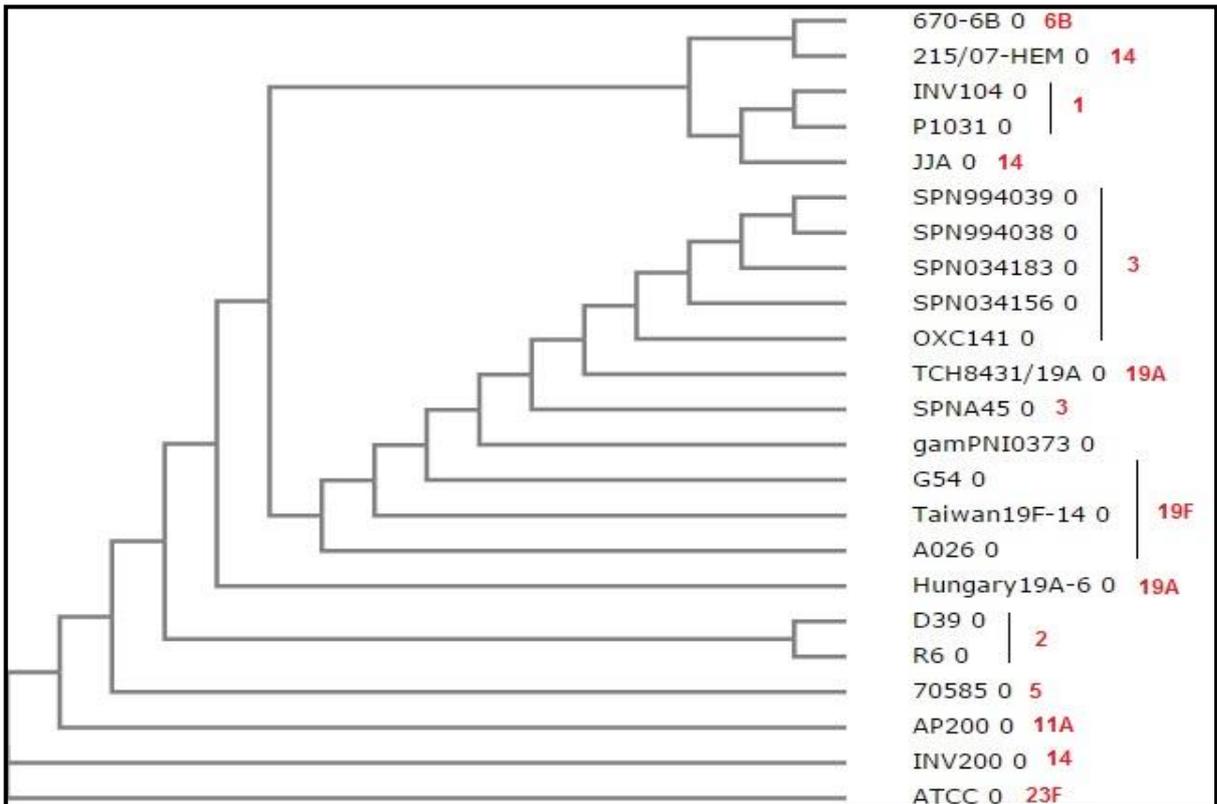


Figura 12: Árvore filogenética do gene *srtA* de *S. pneumoniae*. A árvore foi gerada a partir do programa ClustalW2. Os números destacados em vermelho correspondem ao sorotipo da linhagem.

Observou-se que as linhagens que possuem maior proximidade genômica pertenceram ao mesmo clado e que, embora a maioria dos sorotipos esteja relacionada com esta distribuição, nem todas as linhagens de um mesmo sorotipo foram agrupadas no mesmo clado. Estes resultados sugerem que o agrupamento baseado na sequência da *SrtA* é dado, independentemente, do sorotipo capsular. Estas conclusões são sustentadas por um estudo desenvolvido por Donati e colaboradores (2010) em que foi demonstrada uma baixa correlação entre o sorotipo e localização geográfica das linhagens e o agrupamento em clados quando construída uma árvore filogenética a partir de vários genomas de *S. pneumoniae*. O estudo propôs também que a recombinação homóloga envolvendo trechos curtos foi o processo dominante evolutivo do genoma. Rolo e seus colaboradores (2009) também demonstraram que em análises envolvendo a proteína PspA de *S. pneumoniae* os clados não foram relacionados aos sorotipos e sim ao genótipo.

A grande diversidade dos sorotipos de *S. pneumoniae* demonstra que a produção de vacinas para este patógeno representa um imenso desafio. Baseado nos resultados de identidade e conservação da *SrtA*, comparando-se linhagens de diferentes sorotipos, uma vacina formulada com esta proteína recombinante poderia fornecer uma proteção de maior cobertura vacinal para diversos sorotipos.

5.1.3 Predição de epítomos

O epítomo é considerado a parte de um antígeno envolvido na ligação específica em anticorpos, provenientes de células B, ou a receptores de células T (WANG & YU, 2004). Para a produção de vacinas de subunidades é importante a identificação de epítomos que estejam envolvidos na indução de uma resposta imune, o que é crucial para o desenvolvimento de uma vacina capaz de inibir uma infecção. Avanços na bioinformática tem permitido análises mais aprofundadas que permitem a predição de epítomos com grande potencial de proteção (ROGAN & BABIUK, 2005).

Com o objetivo de avaliar se a SrtA possui regiões com o potencial de desencadear uma resposta imune, foram feitas predições de epítomos para linfócitos B e T. As predições foram realizadas utilizando a proteína truncada em 30 aminoácidos em sua região N-terminal, o que compreende as regiões de peptídeo sinal e hélice transmembrana. Essas regiões não são facilmente acessíveis por anticorpos, enquanto que peptídeos sinal são clivados durante a translocação, e, portanto, inadequados como epítomos (LINDSKOG et al., 2005).

5.1.3.1 Predição de epítomos lineares para linfócitos B

Os epítomos de linfócitos B são classificados como lineares (contínuos) ou conformacionais (descontínuos). Os epítomos considerados lineares são constituídos por uma única extensão da cadeia polipeptídica. Já os epítomos conformacionais estão afastados na sequência de aminoácidos, porém são trazidos para a proximidade espacial pelo dobramento das proteínas (LARSEN et al., 2006). A maioria dos epítomos é classificada como conformacionais, porém, decifrar estes tipos de epítomos, é considerado uma tarefa difícil (SAHA & RAGHAVA, 2006). Por outro lado, cerca de 10% dos epítomos são classificados como lineares. Na maioria dos casos, os anticorpos podem reagir de maneira cruzada, apenas fracamente, com qualquer fragmento de peptídeo linear do antígeno. É geralmente considerado que esta fraca reação cruzada ocorre, pois, o fragmento de peptídeo representa apenas uma porção de um epítomo mais complexo (PELLEQUER et al., 1991). Desta forma, a identificação de segmentos de peptídeos lineares pode representar o primeiro passo na busca de determinantes antigênicos em organismos patogênicos (LARSEN et al., 2006).

Neste trabalho utilizamos a plataforma IEDB para prever a localização de epítomos de linfócitos B na proteína SrtA. A primeira análise foi baseada na localização dos epítomos lineares (Figura 13). A predição é feita utilizando o *software* BepiPred que prevê a presença e a localização de epítomos lineares. Os resíduos com pontuação acima do limiar de 0.35 são preditos como parte de um epítomo.

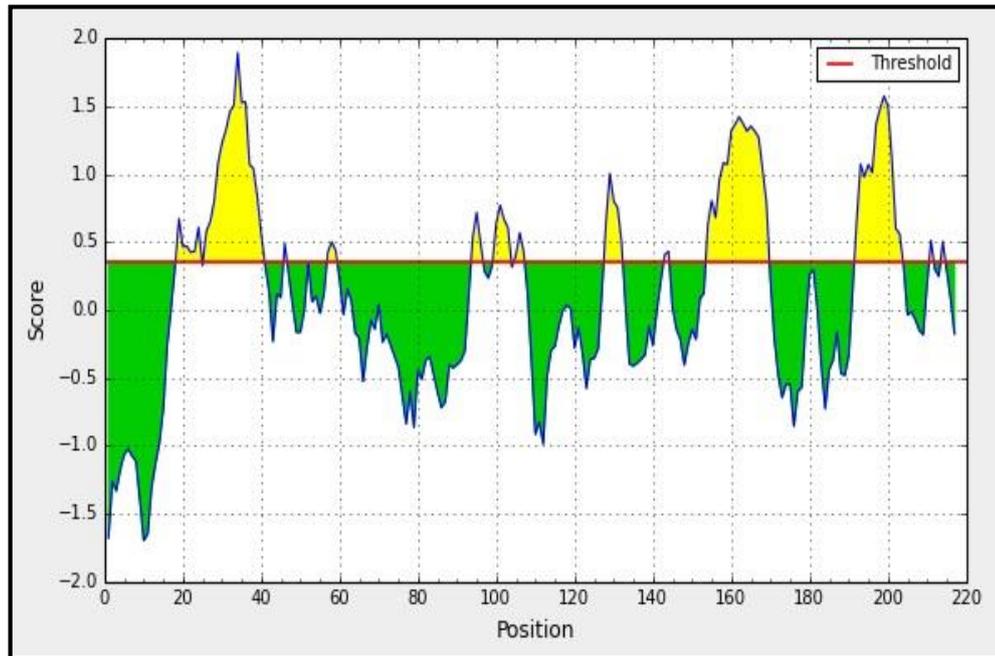


Figura 13: Epítomos lineares de linfócitos B. Resíduos com pontuação acima do limiar de 0.35 são preditos como parte de um epítopo, representado pela cor amarela no gráfico. O eixo X refere-se a posição dos resíduos na sequência da SrtA e o eixo Y ao *score* gerado pelo programa. A linha vermelha representa o limiar a partir do qual identifica-se os epítomos.

A partir da predição foi gerada uma tabela com todos os epítomos lineares preditos (Tabela 4). Foram preditos 13 epítomos lineares, porém a maioria apresentou sequências muito curtas, podendo sugerir epítomos não específicos. Desta forma, consideraram-se aqueles que possuíssem pelo menos 10-*mer*. Foram identificados três epítomos principais geradores de uma resposta mediada por linfócitos B: posição 26-40 (15-*mer*), 154-169 (16-*mer*) e 192-203 (12-*mer*).

Tabela 4: Epítomos preditos de linfócitos B

No.	Start	End	Peptide	Length
1	19	24	YQVSQV	6
2	26	40	KEKLEENQDTEGNFD	15
3	46	46	A	1
4	57	59	WNA	3
5	94	96	TMK	3
6	100	103	VMGE	4
7	105	107	NYS	3
8	128	132	DNAKN	5
9	143	144	KV	2
10	154	169	RVTPDRVDEVDDRQGV	16
11	192	203	LKETKDYSQTSQ	12
12	211	211	Q	1
13	214	214	K	1

Diante dos epítomos preditos, foi realizada a predição da hidrofobicidade da SrtA, utilizando o IEDB. Para esta análise, uma escala hidrofóbica é baseada nos tempos de retenção previsto do peptídeo durante uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), quanto maior o tempo de retenção, mais hidrofóbico (PARKER et al., 1986). A determinação das regiões hidrofóbicas da SrtA encontra-se representadas na figura 14.

Pode-se observar que existem três principais regiões hidrofóbicas, sendo elas: região 1: entre os resíduos Asparagina (15) e Serina (43); região 2: entre os resíduos Glutamato (148) e Asparagina (170); região 3: entre os resíduos Aspartato (191) e Isoleucina (205). Estas regiões altamente hidrofóbicas correspondem aos locais onde foram preditos os epítomos lineares.

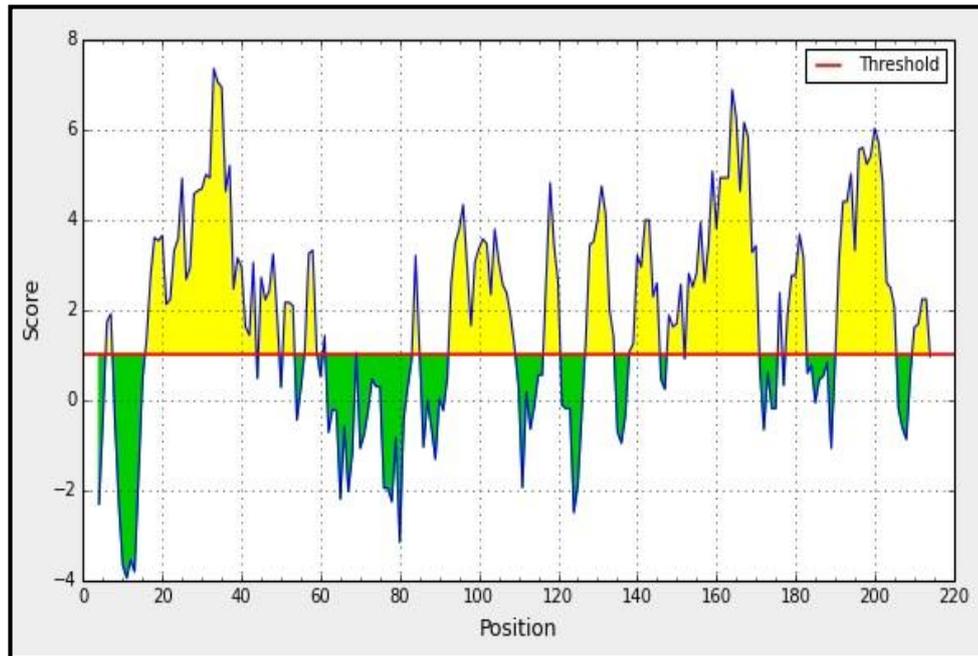


Figura 14: Predição da hidrofiliicidade da SrtA. Os resíduos com pontuação acima do limiar de 1.0 são considerados hidrofílicos representados pela cor amarela. O eixo X refere-se a posição dos resíduos na sequência da SrtA e o eixo Y ao *score* gerado pelo programa. A linha vermelha representa o limiar a partir do qual identifica-se os epítomos.

Além da predição da hidrofiliicidade, é importante também investigar a acessibilidade destas regiões seleccionadas. Esta análise também foi realizada pelo IEDB, onde a partir de cálculos baseados na escala de acessibilidade de um solvente à superfície de um resíduo, o perfil de acessibilidade pode ser obtido (EMINI et al., 1985). O resultado para esta análise está representado figura 15.

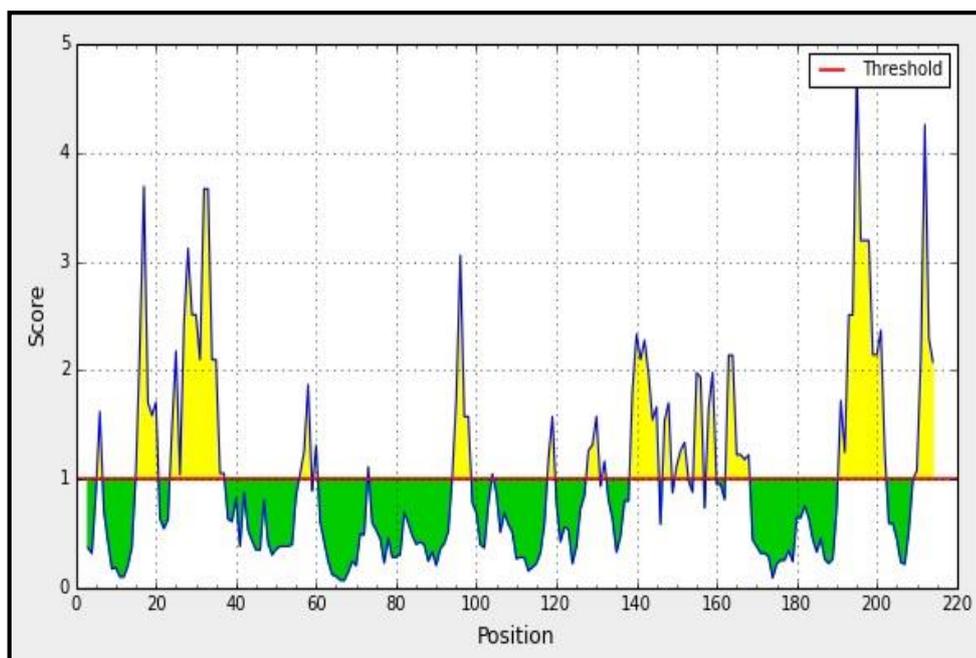


Figura 15: Predição de resíduos acessíveis da proteína SrtA. Os resíduos com pontuação acima do limiar de 1.0 são considerados acessíveis representados pela cor amarela. O eixo X refere-se a posição dos resíduos na sequência da SrtA e o eixo Y ao score gerado pelo programa. A linha vermelha representa o limiar a partir do qual identifica-se os epítomos.

Foram preditas várias regiões acessíveis na SrtA de *S. pneumoniae*. Dentre elas, três regiões principais destacam-se por corresponder aos três epítomos identificados. Na figura 15 as regiões em amarelo as relacionam a elevada acessibilidade: região 1: entre os resíduos Asparagina (15) e Glicina (37); região 2: entre os resíduos Aspartato (128) e Glicina (168); região 3: entre os resíduos Aspartato (191) e Serina (202).

Em conjunto, estas predições demonstram que os três epítomos preditos (15-mer, 16-mer e 12-mer) apresentam características altamente desejáveis para uma região com potencial antigênico. Sabe-se que os locais antigênicos são aqueles reconhecidos por anticorpos, e, portanto, é mais provável que essas regiões sejam mais acessíveis ou estejam na superfície de uma proteína. Uma vez que estes locais estão na superfície, eles provavelmente são mais hidrofílicos (PARKER et al., 1986). Diante de todas estas análises, sugere-se que a SrtA possui potenciais regiões capazes de ativar linfócitos B.

Foi pensado que a SrtA de *S. pneumoniae* pudesse ter potencial imunogênico para outras bactérias do mesmo gênero. Desta forma realizou-se a busca de epítomos lineares para as SrtAs de *S. agalactiae*, *S. pyogenes* e *S. mutans*, e foi observado que nenhum epítomo foi similar aos encontrados para *S. pneumoniae*. Sendo assim, com base nos resultados de alinhamento e identidade juntamente com a predição de epítomos, a utilização de uma vacina formulada com SrtA de *S. pneumoniae* pode não possuir potencial multivalente para as bactérias Gram-positivas analisadas.

5.1.3.2 Predição de epítomos para linfócitos T

Conforme mencionado anteriormente, os epítomos para linfócitos T interagem com seus respectivos receptores, os TCR (receptores de células T) (WANG & YU, 2004). Esta interação só é possível mediante apresentação do peptídeo por moléculas de MHC (HLA em humanos) de classe I ou II pelas APCs (DANILOVA & AMEMIYA, 2009). Lembrando que MHC de classe I apresentam peptídeos antigênicos gerados em uma célula infectada por micro-organismos intracelulares aos linfócitos T CD8⁺, enquanto que MHC de classe II apresentam peptídeos provenientes de micro-organismos extracelulares aos linfócitos T CD4⁺ (NEEFJES et al., 2011). Sendo assim, neste trabalho a predição de epítomos para linfócitos T foi realizada com base nas moléculas de HLA de classe II, uma vez que *S. pneumoniae* é um micro-organismo extracelular.

Para a predição adotou-se o *Web-software* NetMCHII que prediz a ligação de peptídeos a alelos HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP e alelos de MHC de classe II de camundongo. A predição foi feita para moléculas HLA e, para interpretação dos resultados, considerou-se aqueles classificados como peptídeos de forte ligação. Foram preditos 178 epítomos de forte ligação para linfócitos T, sendo que a região onde há a maior concentração de epítomos está entre os aminoácidos Glutamina (33) e Treonina (137). Estes resultados sugerem que a SrtA possui regiões capazes de ativar linfócitos T CD4⁺ e conduzir a formação de memória imunológica, desta forma podendo ser considerada uma potencial candidata vacinal contra *S. pneumoniae*.

Moléculas de HLA são extremamente polimórficas, com milhares de variantes alélicas conhecidos em seres humanos. Grande parte do polimorfismo é concentrado em resíduos localizados no sulco de ligação ao peptídeo, dando a cada variante alélica um padrão de ligação distinto. Sendo assim, é importante lembrar que os dados obtidos neste trabalho são referentes aos alelos de HLA disponíveis para análise no NetMCHII, e, desta forma, devem ser interpretados como um indicativo do potencial imunogênico para as moléculas investigadas. As moléculas disponíveis para análise são consideradas as mais frequentes em diversas populações analisadas no mundo incluindo a América do Sul (GREENBAUM et al., 2011).

5.2 Produção heteróloga da proteína SrtA

As análises, *in silico*, demonstram o grande potencial vacinal da SrtA em *S. pneumoniae* e, desta forma, iniciamos uma estratégia para produção heteróloga de SrtA recombinante de um isolado clínico de *S. pneumoniae* sorotipo 14.

5.2.1 Amplificação da ORF *srtA*

A ORF que codifica a proteína SrtA (742 pb) de *S. pneumoniae*, sorotipo 14, foi amplificada através da técnica de PCR e analisada em gel de agarose 1,0%. Para realização da PCR foram utilizados pares de iniciadores para futura clonagem no vetor pET-21a, objetivando, assim, uma deleção dos primeiros 90 pb correspondente aos 30 aminoácidos que compreendem ao peptídeo sinal e à hélice transmembrana. A figura 16 representa um gel de eletroforese em agarose evidenciando o amplicon de 652 pb (canaleta 1).

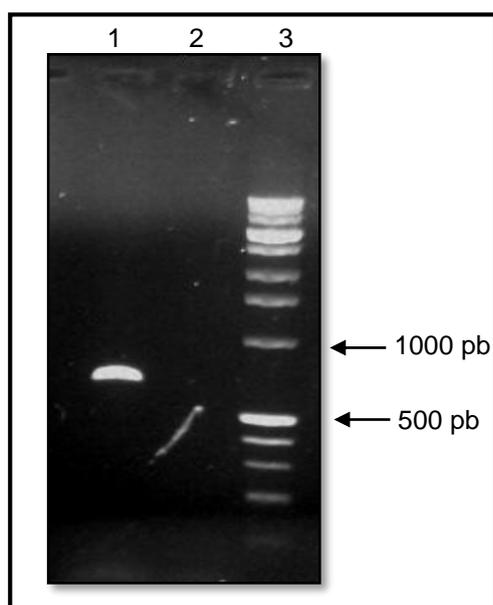


Figura 16: Amplificação da ORF *srtA*. Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo onde observa-se um fragmento correspondente a amplificação do gene codificador da proteína SrtA de *S. pneumoniae* sorotipo 14. Canaletas: 1 – Fragmento de amplificação específico; 2 – Controle negativo; 3 - Padrão de peso molecular (1Kb DNA Ladder plus Affymetrix).

Conforme discutido anteriormente, regiões N-terminal que possuem peptídeo sinal e hélice transmembrana, são regiões que não estão expostas para interação com anticorpos. Além disso, essas regiões são muito hidrofóbicas, principalmente as hélices transmembranares (PETERSEN et al., 2011). Já é bem estabelecido que a produção excessiva de proteínas heterólogas no citoplasma de *E. coli* pode conduzir a formação de corpos de inclusão (BANEYX, 1999) e, sendo assim, a presença dessas regiões hidrofóbicas poderia facilitar a formação de agregados insolúveis. Objetivando, então, um melhor rendimento da expressão e purificação da proteína SrtA, excluiu-se 30 aminoácidos da região N-terminal.

5.2.2 Clonagem da ORF *srtA*

Para realizar a clonagem, primeiramente o plasmídeo pET-21a e o fragmento (*srtA*) amplificado anteriormente foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. A figura 17 representa a digestão enzimática do plasmídeo, indicando que a linearização foi bem sucedida, apresentando um único fragmento 5.443 pb.

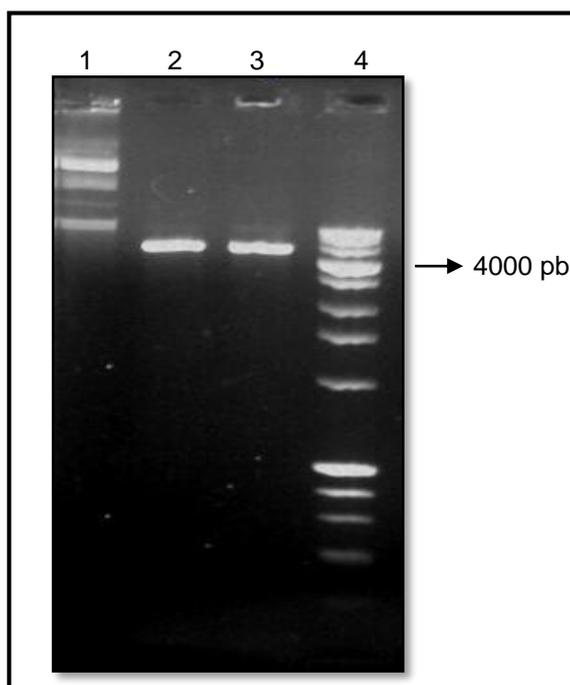


Figura 17: Digestão do plasmídeo pET-21a. Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo mostrando a digestão do plasmídeo com suas respectivas enzimas de restrição. Canaletas: 1 – Plasmídeo íntegro; 2 – Plasmídeo digerido com *Nde-I*; 3 – Plasmídeo digerido com *Xho-I*; 4 – Padrão de peso molecular (1Kb DNA Ladder plus Affymetrix).

Os produtos digeridos e purificados, correspondentes à ORF *srtA* e ao plasmídeo, foram submetidos a uma reação de ligação. O produto de ligação foi utilizado para transformar células quimiocompetentes *E. coli* NM522. Após a transformação, foram selecionados clones, de forma aleatória, para confirmação da presença da ORF clonada, através de PCR de colônia. Na figura 18 é possível observar a presença do amplicon de tamanho esperado (652 pb) das PCRs de colônia, confirmando que os clones selecionados apresentavam a ORF *srtA* clonada.

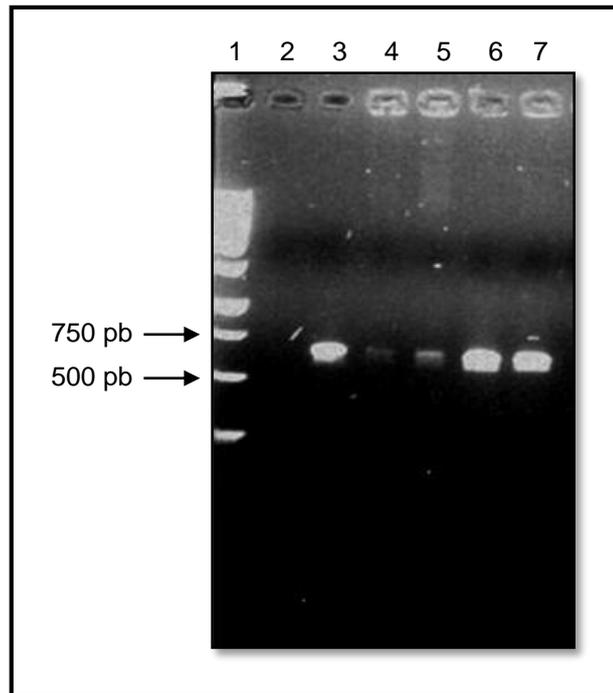


Figura 18: Confirmação dos produtos de PCR amplificados de colônias. Gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo mostrando a PCR das colônias positivas de *E. coli* NM522 contendo o gene *srtA*. Canaletas: 1 – Padrão de peso molecular (1Kb DNA Ladder Fermentas); 2 – Controle negativo; 3 – Controle positivo; 4 a 7 – Colônias.

O plasmídeo (pET-21a/ *srtA*) foi extraído a partir dos clones positivos utilizando o kit MiniPrep da Axygen Biosciences, avaliados por PCR quanto a presença da ORF e sequenciados para confirmação da presença da ORF *srtA*. Dos clones sequenciados, em um foi possível analisar toda a sequência sem falhas na fase de leitura da ORF *srtA* (Figura 19). Este, por sua vez, foi escolhido para dar continuidade aos próximos experimentos.

```

TAATACGACTCACTATAGGGGGAATTTGTGAGCGGATTAACAATTCCCCTCTAGAAAATAATTT
TGTTTAACTTTAAAGAAGGAGATATACATATGTTGATTTTAACTCAAATTCGAAATATTTT
CATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAGAAAAATTAGAAGAA
AATCAGGATACAGAAGGCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCGGAAGCTGT
TCTAACTTCTCAATGGAATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAGAGCTGGTACAATGA
AACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCTAGTCACCATATCTTTGGTGT
TGATAATGCTAATAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAATGCTAAAAATGGCATGAAGATTTA
TCTAACCGATAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATACGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGG
ATCGTGTTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTCAATGAAATCACATTAGTAACCTGTGA
AGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAAGGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATT
CACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTCAATCAACCATATAACAATTTTATCTCGAG
CACCACCACCACCAC

```

Figura 19: Sequenciamento pET-21a/*srtA*. As regiões destacadas em negrito correspondem ao promotor T7, sequência *srtA* -90 pb e a cauda de histidina, respectivamente.

O alinhamento da sequência completa da ORF *srtA* (742 pb) com a sequência obtida (652 pb), foi realizado através do programa ClustalW2, confirmando que a PCR não gerou mutações na sequência a ser expressa. A região inicial de 90 pb está representada na sequência original (Figura 20).

Sequencia_original	ATGTCTCAAAAAATAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGAC	50
Plasmideo_sequenciado	-----	
Sequencia_original	AAATATCCTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCAGTGGCTTTGATTTTAA	100
Plasmideo_sequenciado	-----TTGATTTTAA	10

Sequencia_original	ATACTCAAATTCGAAATATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAA	150
Plasmideo_sequenciado	ATACTCAAATTCGAAATATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAA	60

Sequencia_original	GTTAGCCAGGTATCAAAGAAAAATTAGAAGAAAATCAGGATACAGAAGG	200
Plasmideo_sequenciado	GTTAGCCAGGTATCAAAGAAAAATTAGAAGAAAATCAGGATACAGAAGG	110

Sequencia_original	CAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCGGAAGCTGTTCTAA	250
Plasmideo_sequenciado	CAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCGGAAGCTGTTCTAA	160

Sequencia_original	CTTCTCAATGGAATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCAATT	300
Plasmideo_sequenciado	CTTCTCAATGGAATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCAATT	210

Sequencia_original	CCTGAATTGGAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAA	350
Plasmideo_sequenciado	CCTGAATTGGAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAA	260

Sequencia_original	TCTCTTCTACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAG	400
Plasmideo_sequenciado	TCTCTTCTACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAG	310

Sequencia_original	GAAATATAGTCTAGCTAGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAAT	450
Plasmideo_sequenciado	GAAATATAGTCTAGCTAGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAAT	360

Sequencia_original	AAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAATGCTAAAAATGGCATGAAGATTTA	500
Plasmideo_sequenciado	AAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAATGCTAAAAATGGCATGAAGATTTA	410

Sequencia_original	TCTAACCGATAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATACGTGAAGTCAAAC	550
Plasmideo_sequenciado	TCTAACCGATAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATACGTGAAGTCAAAC	460

Sequencia_original	GTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTCAAT	600
Plasmideo_sequenciado	GTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTCAAT	510

Sequencia_original	GAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTAT	650
Plasmideo_sequenciado	GAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTAT	560

Sequencia_original	TGTCAAAGGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATG	700
Plasmideo_sequenciado	TGTCAAAGGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATG	610

Sequencia_original	AAATCCTAACAGCTTTCAATCAACCATATAACAATATTTAT	742
Plasmideo_sequenciado	AAATCCTAACAGCTTTCAATCAACCATATAACAATATTTAT	652

Figura 20: Alinhamento da sequência nucleotídica ao gene *srtA* no programa ClustalW2. O (*) indica bases iguais.

5.2.3 Expressão da proteína SrtA em *Escherichia coli Rosetta gami*

Para a expressão da proteína SrtA, o vetor pET-21a foi selecionado por possuir características que otimizam a expressão e purificação de proteínas recombinantes. Este vetor possui um promotor T7 que é reconhecido pela RNA polimerase de *E. coli*. A transcrição dessa RNA polimerase é regulada pelo operador *lac* (*lacO*), que é induzível por IPTG. O IPTG por sua vez interage com o repressor *lac* (*lacI*) e libera o operador *lacO*, permitindo assim a transcrição do gene.

A utilização da *E. coli* linhagem *Rosetta gami* também é importante por possuir tRNA para códons raros, uma vez que quando o mRNA de genes heterólogos é expresso em *E. coli*, as diferenças na utilização de códons podem impedir a tradução devido a exigência de um ou mais tRNA. tRNAs insuficientes podem levar ao término prematuro da tradução ou incorporação inadequada de aminoácidos (WIDMANN et al., 2008).

Células quimiocompetentes da linhagem *Rosetta gami* foram transformadas com o plasmídeo pET-21a/*srtA*, previamente sequenciado. Um clone foi escolhido para testes de expressão sob indução com IPTG. O extrato total de proteínas foi resolvido em gel de poliacrilamida 15% e foi possível observar a banda de intensidade crescente no peso molecular esperado, entre 25 e 30 kDa, para a proteína SrtA (Figura 21).

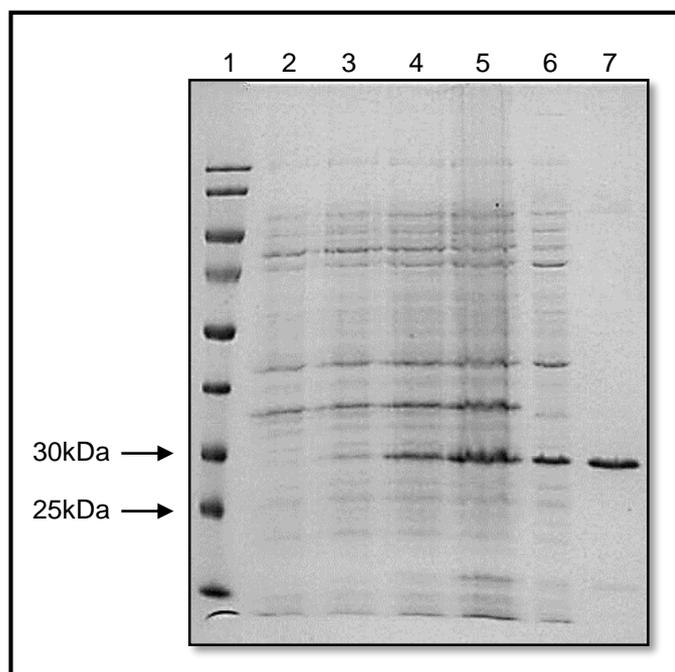


Figura 21: Cinética de expressão e teste de solubilidade. Expressão demonstrada em um gel de poliacrilamida 15% corado com Azul de Coomassie. Canaletas: 1 – Padrão de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific); 2 – T₀; 3 – T₁; 4 – T₂; 5 – T₃; 6 – Sobrenadante; 7 – Precipitado.

O produto obtido após 3 horas de expressão foi utilizado para determinar a solubilidade da proteína SrtA recombinante. A análise de solubilidade, canaletas 6 e 7 da figura 21, mostrou que a proteína se manteve, parcialmente, na forma solúvel, condição escolhida para os experimentos subsequentes de purificação.

5.2.4 Purificação da proteína SrtA recombinante

Após a determinação da solubilidade da proteína, conduziu-se uma nova expressão em maior escala (200 mL), seguindo as mesmas condições de expressão descritas anteriormente. A fração solúvel da expressão foi utilizada para purificação da proteína SrtA pelo método de cromatografia líquida por afinidade da cauda de histidina à coluna de níquel (Figura 22). A análise mostrou que a purificação foi bem sucedida apresentando apenas a banda de interesse em duas cromatografias realizadas.

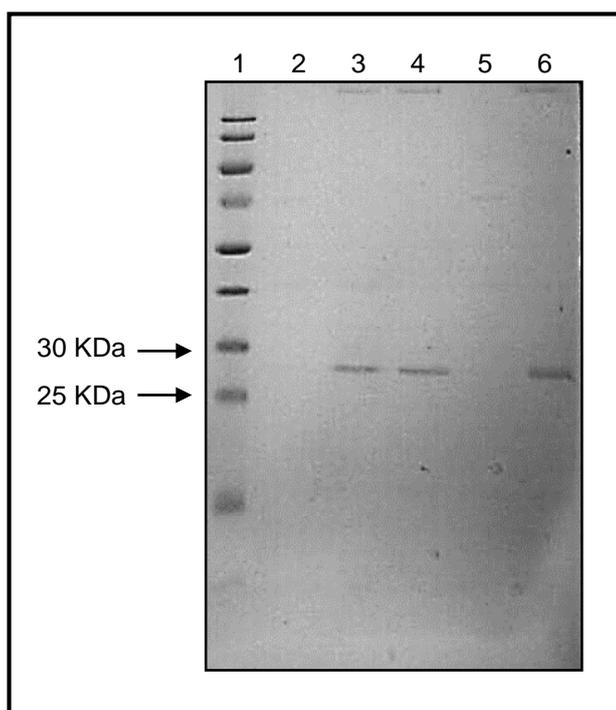


Figura 22: Purificação da proteína SrtA recombinante. Purificação da proteína SrtA demonstrada em um gel de poliacrilamida 15% corado com Azul de Coomassie. Canaletas: 1 – Padrão de peso molecular (PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific); 2 – *Flow*; 3 e 4- Frações referentes ao pico da 1ª corrida; 5 – *Flow*; 6 – Fração referente ao pico da 2ª corrida.

A utilização do vetor pET-21a também favorece a purificação devido a presença da cauda de histidina. Colunas de cromatografia de afinidade podem ser carregadas com diferentes tipos de metais, como o Ni^{2+} . A afinidade da cauda de histidina por estes metais permite a separação da proteína recombinante da maioria das outras proteínas bacterianas.

A proteína é purificada pela passagem do extrato da expressão por uma coluna de resina carregada pelo íon metálico. A proteína de interesse interage com o íon e pode ser recuperada através da utilização de soluções que também possuem afinidade pelo íon, como o Imidazol (HENGGEN, 1995). Esta molécula possui a mesma estrutura que a cadeia lateral de histidina e compete efetivamente pelo Ni^{2+} , levando a eluição das proteínas ligadas sem causar desnaturação (JANKNECHT et al., 1991).

5.2.5 Confirmação da presença da cauda de histidina e imunogenicidade da SrtA por Western blot

A cinética de expressão e o peso molecular apresentados pela proteína expressa são fortes indicadores de que esta seja a proteína SrtA. Além disso, a proteína purificada foi resolvida por SDS-PAGE e foi realizado um Western blot utilizando o anticorpo específico anti-His e soro de coelho, previamente imunizado com a proteína SrtA recombinante purificada. Na figura 23 (A) é possível observar a marcação de uma banda de peso molecular esperado para a proteína SrtA recombinante, contendo a cauda de histidinas e na (B) observa-se que o soro de coelho reconheceu a proteína expressa e purificada indicando um potencial imunogênico.

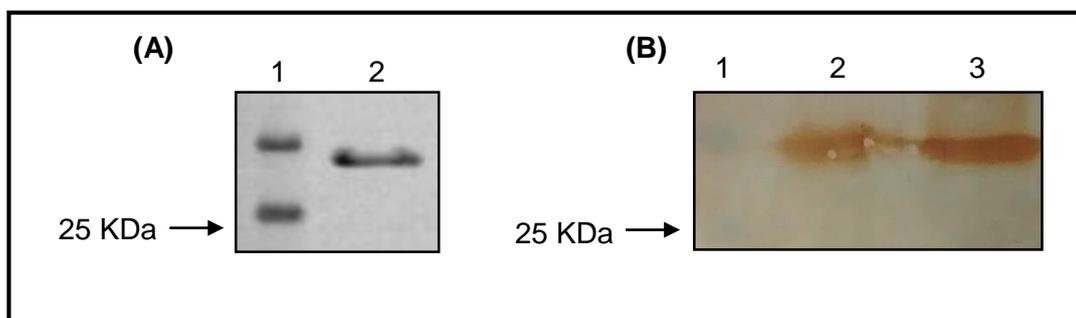


Figura 23: Western blot para confirmação da cauda de histidina e imunogenicidade da proteína SrtA. (A) Revelação com anticorpo anti-His. Canaletas: 1 – Padrão de peso molecular, 2 – Proteína SrtA recombinante purificada. (B) Revelação com soro de coelho. Canaletas: 1 – Padrão de peso molecular, 2 – T_3 da expressão, 3 – Proteína SrtA recombinante purificada.

5.3 Avaliação do potencial imunogênico da proteína SrtA

5.3.1 Avaliação da resposta imune humoral

Para avaliar o nível de resposta humoral, os camundongos foram imunizados três vezes, com intervalo de 15 dias, via intraperitoneal, com a proteína recombinante SrtA associada ao adjuvante de Freund. A dosagem de anticorpos anti-SrtA foi feita a partir do soro

dos camundongos 7 dias após a última imunização. A avaliação da resposta humoral mostrou uma produção elevada de anticorpos IgG anti-SrtA nos animais vacinados ($2,5 \pm 0,07$) em relação ao grupo controle ($0,04 \pm 0,05$) (Figura 24).

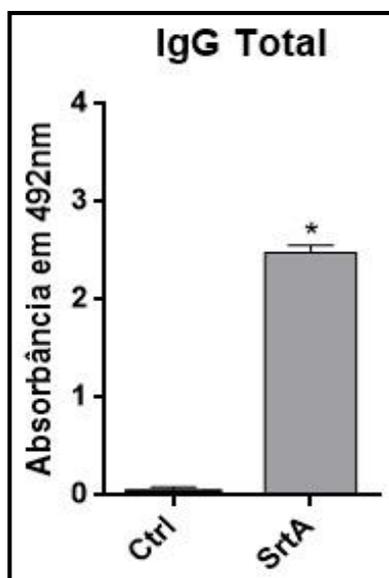


Figura 24: Níveis de anticorpos IgG anti-SrtA do soro de camundongos após três imunizações. (Média \pm Desvio padrão) Comparação dos níveis de IgG entre os grupos controle não vacinado (Ctrl) e vacinado com SrtA recombinante. (*) $P < 0,05$.

Devido a produção de níveis elevados de IgG anti-SrtA, pode-se afirmar que a imunização foi eficiente, gerando uma diferença, estatisticamente significativa, dos animais vacinados comparado ao controle não vacinado. Este resultado corrobora o estudo de Gianfaldoni e colaboradores (2009) que demonstraram que SrtA recombinante foi capaz de gerar altos níveis de IgG em camundongos imunizados via intraperitoneal. Min e colaboradores (2012), também demonstraram a produção de níveis elevados quando os animais foram imunizados via intranasal ou intraperitoneal.

Foram analisados também os níveis de produção de diferentes subclasses de IgGs, sendo IgG1 e IgG2a, conforme apresentado na figura 25. Ambas as subclasses apresentaram níveis, significativamente maiores, nos animais vacinados com a proteína SrtA recombinante comparados ao grupo controle não vacinado (IgG1: $2,4 \pm 0,4$ versus $0,01 \pm 0,2$ no grupo controle; IgG2a: $2,0 \pm 0,2$ versus $0,004 \pm 0,02$ no grupo controle). As análises demonstraram que as respostas foram semelhantes (IgG1/IgG2a: $0,9 \pm 0,4$).

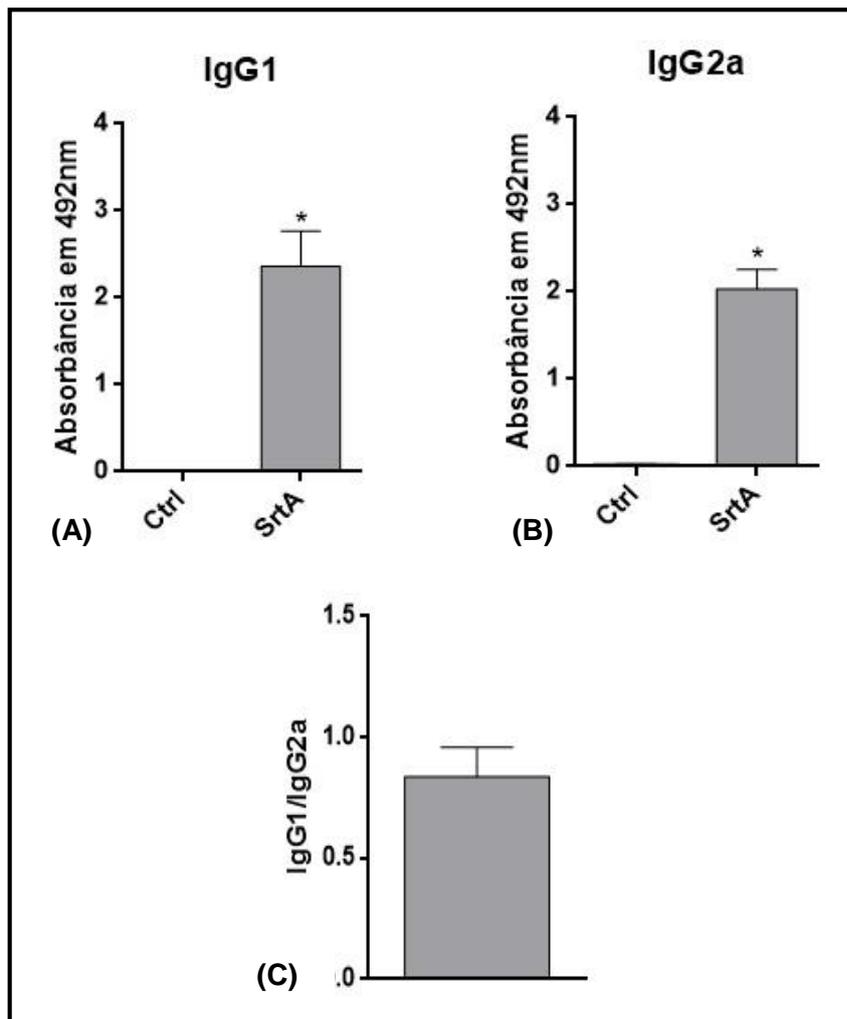


Figura 25: Níveis de subclasses de anticorpos IgG do soro de camundongos após três imunizações. (Média \pm Desvio padrão) (A) Comparação dos níveis de IgG1 entre os grupos controle não vacinado (Ctrl) e vacinado com SrtA recombinante. (*) $P < 0,05$. (B) Comparação dos níveis de IgG2a entre os grupos controle não vacinado (Ctrl) e vacinado com SrtA recombinante. (*) $P < 0,05$. (C) Razão entre IgG1 e IgG2a ($R=0,836$).

O sistema do complemento é um componente importante da resposta imune inata de agentes patogênicos bacterianos, incluindo *S. pneumoniae*. A via clássica do complemento é ativada pelo complexo antígeno-anticorpo na superfície bacteriana e agem como opsoninas, aumentando a fagocitose e determinando sua morte (BROWN et al.,2002). A via clássica pode ser ativada por IgG específica e é, geralmente, considerado um efetor da imunidade adaptativa (HYAMS et al., 2010). A opsonofagocitose, portanto, constitui um importante mecanismo de defesa contra pneumococos invasivos. Estudos demonstram que a infecção de camundongos com deficiências genéticas em componentes do complemento culmina em uma ativação deficiente de macrófagos e rápida progressão de septicemia (BROWN et al.,2002), assim como pacientes com deficiência em componentes da via clássica são mais susceptíveis a infecções por *S. pneumoniae* (YUSTE et al., 2008). Desta forma, a importância dos anticorpos específicos na redução de bacteremia e indução de proteção contra *S.*

pneumoniae, foi confirmada através de estudos utilizando a imunização passiva em modelos de sepse e pneumonia (GIANFALDONI et al., 2009; COHEN et al., 2011).

Neste estudo, a produção de ambas as subclasses foram semelhantes, sugerindo um balanço entre IgG1 e IgG2a. Este resultado também indica um equilíbrio entre respostas Th1 e Th2, uma vez que em camundongos, IgG1 está relacionada ao desenvolvimento preferencial de uma resposta Th2, enquanto IgG2a está associada ao desenvolvimento de uma resposta preferencialmente Th1. Cada subclasse pode contribuir para o depuramento de bactérias por diferentes mecanismos. IgG2a, por exemplo, exibe forte ligação aos receptores Fc e é considerada a subclasse com maior capacidade de mediar a deposição do complemento na superfície pneumocócica. Já IgG1 pode ligar-se, cooperativamente, em bactérias e fornecer proteção. Estudos demonstram que o balanço IgG1/IgG2a medeia melhor a deposição do complemento pois, se grandes quantidades de IgG1 são induzidas, a ligação por IgG2a pode ficar comprometida mediante bloqueio por IgG1, sendo assim, o equilíbrio parece ser benéfico (LEFEBER et al., 2003; FERREIRA et al., 2008).

5.3.2 Determinação da DL₅₀ para desafio intranasal

Para análises relacionadas à infecção intranasal, inicialmente foi feito um experimento de determinação da DL₅₀. Três grupos de 8 camundongos cada, foram desafiados com 10³, 10⁴ ou 10⁵ UFC/animal de um isolado clínico pertencente ao sorotipo 4. O acompanhamento da sobrevivência dos animais foi realizado durante um período de 10 dias. O inóculo 10³ UFC gerou uma letalidade de 25% nos animais enquanto o inóculo 10⁵ produziu uma letalidade de 60%. No entanto, o inóculo de 10⁴ representa a DL₅₀ para a linhagem de *S. pneumoniae* utilizada (Figura 26).

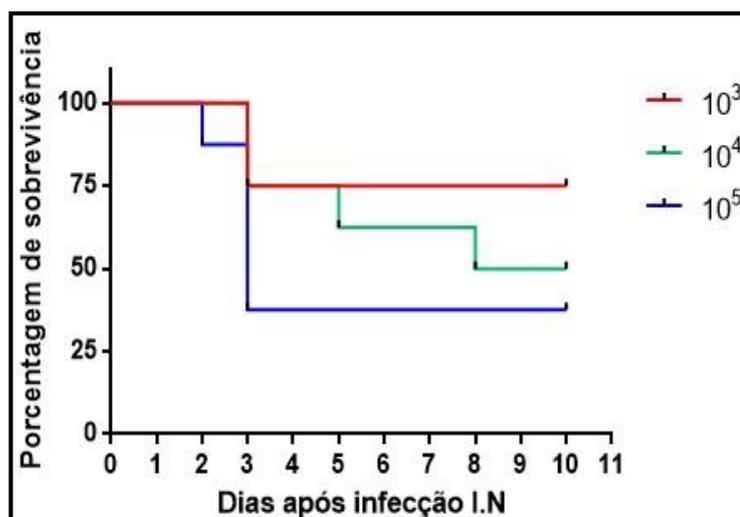


Figura 26: Determinação da DL50 de camundongos desafiados com *S. pneumoniae* via intranasal. Em vermelho a porcentagem de óbitos para o inóculo de 10^3 , em verde para o inóculo 10^4 e azul o inóculo 10^5 .

5.3.3 Avaliação da resposta inflamatória

Desta forma, camundongos imunizados via intraperitoneal foram desafiados com 2×10^5 UFC/animal ($20 \times DL_{50}$), via intranasal, 15 dias após a última imunização. Os animais foram eutanasiados 24 h após o desafio e o lavado bronco-alveolar (BAL) foi coletado. O perfil inflamatório foi avaliado a partir da contagem global de células presentes no BAL. Os resultados (Figura 27) mostram que os camundongos que foram somente imunizados com a proteína SrtA recombinante apresentaram número de células normais indicando que a vacinação não alterou o perfil de células no pulmão ($0,1 \times 10^6 \pm 0,03$). Já os animais não vacinados e infectados (Sp) apresentaram um aumento de células conforme esperado ($1,1 \times 10^6 \pm 0,3$), demonstrando que a infecção foi efetiva. Por fim, os animais que foram vacinados e infectados (SrtA+Sp) apresentaram um aumento de células no pulmão, porém foi, significativamente menor, comparado ao grupo não vacinado ($0,7 \times 10^6 \pm 0,1$), sugerindo que a vacinação foi capaz de modular o infiltrado pulmonar.

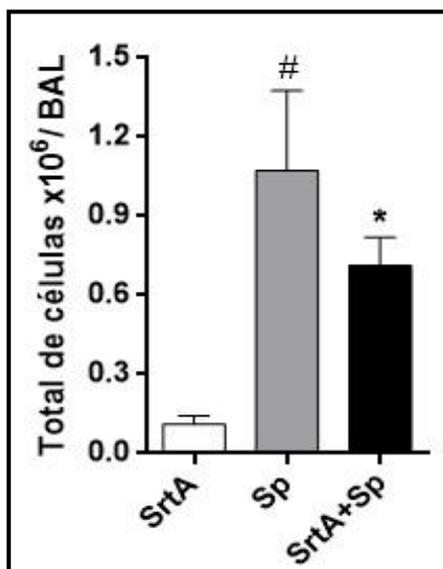


Figura 27: Contagem total de células por BAL. (Média ± Desvio padrão) O grupo infectado (Sp) apresentou um aumento significativo de células no pulmão comparado ao grupo não infectado (SrtA). (#) $P < 0,05$. O grupo vacinado (SrtA+Sp) apresentou uma migração significativamente menor de células no pulmão comparado ao grupo não vacinado (Sp). (*) $P < 0,05$.

Após a contagem de células totais foi realizada a contagem diferencial com o objetivo de avaliar o perfil de células inflamatórias presentes no pulmão. Na figura 28 (A) estão apresentados os resultados referentes à contagem de macrófagos e pode-se observar que o grupo SrtA apresentou níveis normais, mostrando, novamente, que a vacinação não foi capaz de alterar o perfil celular ($0,1 \times 10^6 \pm 0,06$). Já os grupos Sp ($0,6 \times 10^6 \pm 0,3$) e SrtA+Sp ($0,6 \times 10^6 \pm 0,1$) apresentaram níveis elevados de macrófagos indicando a ocorrência de um processo inflamatório. Em paralelo, foi realizada também a contagem de neutrófilos que estão apresentados na figura 28 (B). Como esperado, não foram encontrados neutrófilos no grupo SrtA. Por outro lado, os grupos Sp ($0,1 \times 10^6 \pm 0,07$) e SrtA+Sp ($0,1 \times 10^6 \pm 0,04$) apresentaram também níveis elevados de neutrófilos cooperando com os resultados de macrófagos confirmando que a infecção foi efetiva. Os resultados mostram que os animais SrtA+Sp não foram capazes de modular o perfil de células do infiltrado pulmonar.

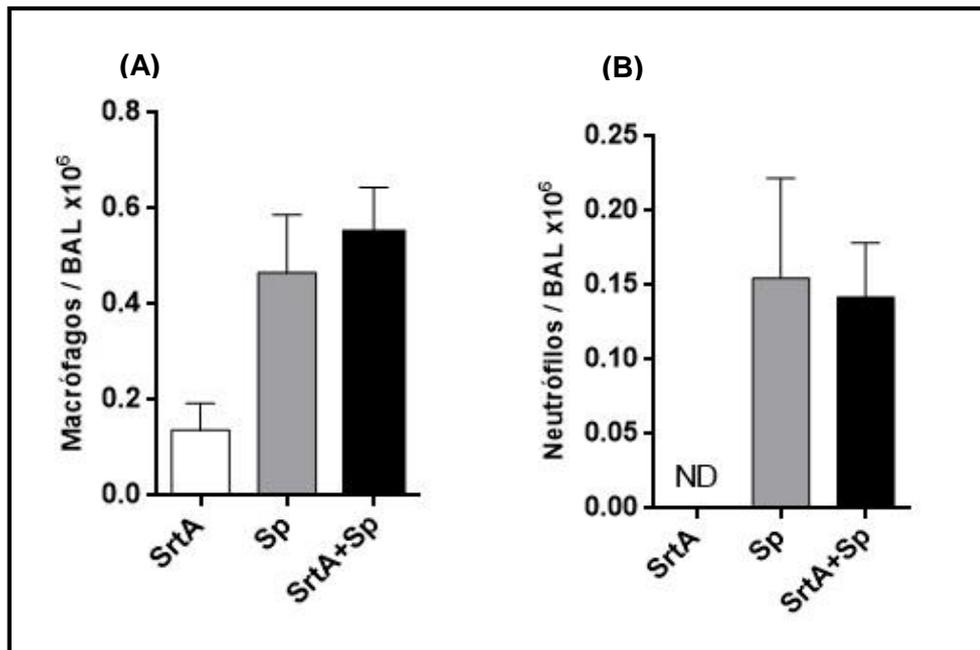


Figura 28: Contagem diferencial de células por BAL. (Média \pm Desvio padrão) O gráfico (A) representa a contagem de macrófagos. O gráfico (B) representa a contagem de neutrófilos. ND – Não detectado.

Estes resultados demonstram que camundongos vacinados com SrtA recombinante foram capazes de controlar o infiltrado celular quando comparado aos animais que não receberam a vacina. Este resultado parece ser benéfico uma vez que o aumento de células inflamatórias no pulmão pode aumentar a lesão tecidual (PUTTE et al., 2004; RAZAVI et al., 2004). Sendo assim, provavelmente, os anticorpos gerados através da vacinação contribuem para deposição do complemento influenciando na resolução da inflamação de maneira mais efetiva.

Os macrófagos alveolares são considerados as principais células efetoras na defesa do hospedeiro contra infecções do trato respiratório em virtude de suas potentes propriedades fagocíticas. Quando um grande número de micro-organismos é introduzido nas vias aéreas inferiores, neutrófilos são recrutados e tornam-se as principais células fagocitárias, predominando o infiltrado celular (POLL & OPAL, 2009). Neste trabalho observou-se que os animais do grupo Sp e SrtA+Sp, não apresentaram diferenças no perfil de macrófagos. Knapp e colaboradores (2003) demonstraram que camundongos deficientes de macrófagos infectados com *S. pneumoniae* apresentaram uma mortalidade, significativamente maior, comparado aos animais normais além de apresentar um aumento de células apoptóticas devido a falta de mecanismos de depuração eficientes. Além disso, nossos resultados são similares aos encontrados por Gianfaldoni e colaboradores (2009) que demonstraram que a vacinação com a SrtA não alterou o infiltrado de macrófagos.

Conforme já mencionado, os neutrófilos também são considerados células importantes na defesa contra micro-organismos invasores. Essas células são recrutadas para os locais da infecção através de sinais de quimiocinas e citocinas para diminuir ou eliminar infecções (KOBAYASHI et al., 2003). Jones e colaboradores (2005) demonstraram que camundongos deficientes para receptores de sinalização de IL-1 β e TNF- α , citocinas que são rapidamente induzidas após exposição microbiana, tiveram um recrutamento de neutrófilos, significativamente diminuído, e também apresentaram redução na depuração bacteriana em camundongos infectados com *S. pneumoniae*, confirmando desta forma a importância dos neutrófilos durante um processo infeccioso. Ferreira e colaboradores (2009) demonstraram que camundongos imunizados com a proteína PspA5 de *S. pneumoniae* apresentaram níveis, significativamente maiores, de neutrófilos comparado a animais que não receberam a proteína, além de apresentarem liberação de citocinas pró-inflamatórias, níveis elevados de IgG2a e deposição do complemento eficiente que, em conjunto, contribuíram para uma proteção de 60% dos camundongos vacinados quando desafiados via intranasal. Desta forma, embora não tenha sido observado diferença nos perfis celulares, a imunização com SrtA recombinante pode ser benéfica em controlar os efeitos sobre a lesão tecidual.

Por outro lado, Gianfaldoni e colaboradores (2009) demonstraram que camundongos não vacinados apresentaram níveis, significativamente maiores, de neutrófilos do que camundongos que receberam SrtA recombinante. É importante ressaltar que estes resultados foram obtidos com a utilização de 10^7 UFC/animal, 50x mais a quantidade utilizada para desafio neste trabalho; além disso, a coleta do BAL foi realizada 48 h após a infecção, podendo sugerir que, neste período, os animais vacinados foram capazes de modular o processo inflamatório de maneira mais eficiente do que os animais não vacinados.

5.3.4 Desafio intranasal e intraperitoneal

Para avaliar o potencial protetor da proteína SrtA através da via de curso natural da doença pneumocócica invasiva, camundongos foram desafiados com 5×10^4 UFC/animal ($5 \times DL_{50}$) 7 dias após a última imunização, via intranasal. A figura 29 mostra o percentual de sobrevivência dos camundongos em um período de 14 dias após infecção. O decurso da infecção acontece de forma semelhante até o 3° dia para o grupo vacinado e não vacinado, sendo que, no 5° dia, há um aumento do número de óbitos dos animais não vacinados que se mantem até o 14° dia. Pode-se verificar que os animais vacinados com a SrtA recombinante apresentaram uma sobrevida de 80% quando comparados aos animais controle não vacinados (50%).

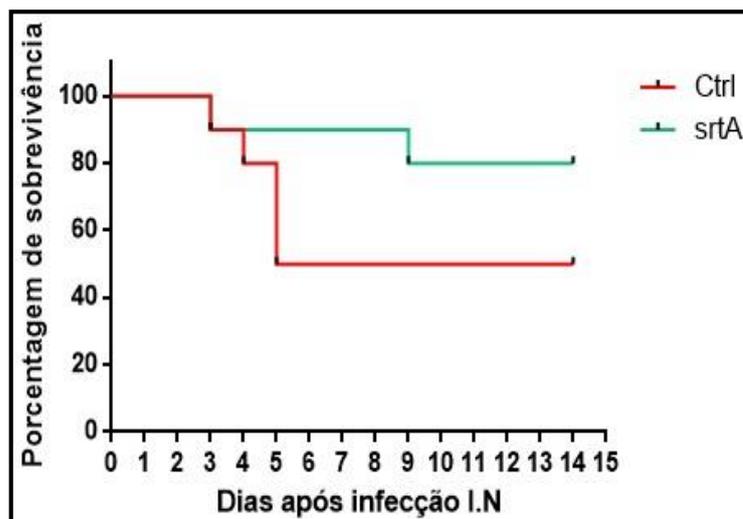


Figura 29: Avaliação da sobrevivência dos camundongos após infecção intranasal. Em vermelho a porcentagem de óbitos do grupo não vacinado e em verde dos animais vacinados.

Com o objetivo de compreender melhor o potencial protetor da SrtA, avaliou-se também, em paralelo, outra via de infecção. Sendo assim, outro grupo de animais vacinados com a proteína SrtA recombinante e não vacinados foi infectado via intraperitoneal com 2×10^4 UFC/animal ($20 \times DL_{50}$). A DL_{50} desta via para o sorotipo 4 foi determinada por Araújo e colaboradores (2012) em 10^3 . A infecção foi realizada 7 dias após a última imunização. A figura 30 mostra o percentual de sobrevivência dos camundongos em um período de 14 dias após infecção. O decurso da infecção acontece de forma igual para o grupo vacinado e não vacinado, porém, após o 5º dia, ocorre uma diminuição da letalidade dos animais vacinados quando comparado aos animais controle. Pode-se verificar que os animais vacinados com a SrtA recombinante apresentaram uma sobrevivência de 30% quando comparados aos animais controle não vacinados (5%).

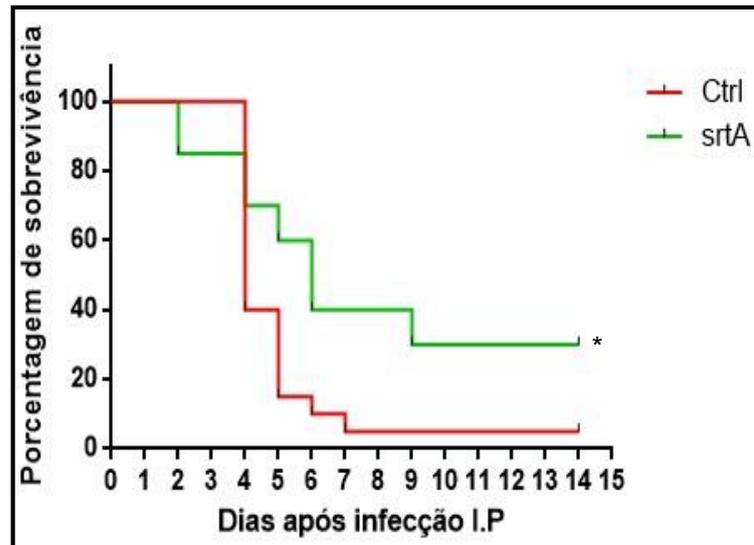


Figura 30: Avaliação da sobrevivência dos camundongos após infecção intraperitoneal. Em vermelho a porcentagem de óbitos do grupo não vacinado e em verde dos animais vacinados. (*) $P < 0,05$.

Os resultados de letalidade corroboram com os encontrados por Gianfaldoni e colaboradores (2009) que demonstraram que camundongos imunizados com a proteína SrtA foram protegidos contra duas linhagens diferentes de *S. pneumoniae* quando infectados via intraperitoneal. Além disso, Min e colaboradores (2012) mostraram que a SrtA teve seu potencial de proteção aumentado quando combinada as proteínas Gts e PotD em camundongos infectados via intranasal ou intraperitoneal. Em conjunto, todos estes resultados mostram que a SrtA é uma proteína promissora que poderia ser considerada para inclusão em uma vacina pneumocócica multivalente.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 Conclusões

Sumarizando os resultados temos:

- A caracterização, *in silico*, da proteína SrtA mostrou seu alto nível de conservação entre diferentes linhagens de *S. pneumoniae* e indicou o grande potencial imunogênico da SrtA contra diferentes sorotipos de *S. pneumoniae*.

- A ORF foi clonada com êxito no plasmídeo pET-21a.

- A proteína SrtA foi expressa e purificada com sucesso.

- Pelos ensaios de Western blot e avaliação da resposta humoral, a proteína SrtA se mostrou altamente imunogênica.

- A partir da dosagem de IgGs, observou-se que a imunização com SrtA recombinante foi capaz de desencadear uma produção significativa das subclasses IgG1 e IgG2, sugerindo um equilíbrio entre respostas Th1 e Th2.

- Apesar da proteína ser capaz de controlar o infiltrado celular, não é capaz de modular o perfil de células inflamatórias.

Os resultados gerados no presente trabalho nos permitem concluir que a proteína SrtA de *S. pneumoniae* possui um grande potencial imunogênico e vacinal, modulando uma resposta imune favorável à proteção do hospedeiro contra o patógeno.

6.2 Perspectivas

Este trabalho abre perspectivas quanto à otimização das formulações vacinais contendo a proteína SrtA com o intuito de se ampliar o potencial protetor frente a outras linhagens e sorotipos de *S. pneumoniae*.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**. 2006; 124(4): 783-801.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002.
- Andersen, M.H., Schrama D., Straten, P.T., Becker, J. C. Cytotoxic T cells. **Journal of Investigative Dermatology**. 2006; 126: 32-41.
- Anderson, A.S., Scully, I.L., Timofeyeva, Y., Murphy, E., Mcneil, L.K., Mininni, T., Nuñez, L., Carriere, M., Singer, C., Dilts, D.A., Jansen, K.U. *Staphylococcus aureus* Manganese Transport Protein C is a highly conserved cell surface protein that elicits protective immunity against *S. aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of Infectious Diseases**. 2012; 205(11): 1688-1696.
- Araújo, H.F., Campos, P.C., Camargo, D.R.A., Pereira, F.N.R., Samuel, M.L., Oliveira, M.A.A., Dias, C.L.F., Leclercq, S.Y. Immune response and protective efficacy of S9 ribosomal protein of *Streptococcus pneumoniae* in a model of sepsis. **Canadian Journal of Microbiology**. 2012; 58(9): 1055-1062.
- Balachandran, P., Walter, A.B., Julkunen, A.V., Hollingshead, S.K., Briles, D.E. Role of Pneumococcal Surface Protein C in nasopharyngeal carriage and pneumonia and its ability to elicit protection against carriage of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**. 2002; 70(5): 2526-2534.
- Baneyx, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. 1999; 10(5): 411-421.
- Bierne, H., Mazmanian, S.K., Trost, M., Pucciarelli, M.G., Liu, G., Dehoux, P., Jansch, L., Portillo, F.G., Schneewind, O., Cossart, P. Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. **Molecular Microbiology**. 2002; 43(4): 869-881.
- Black, S., Shinefield, H., Fireman, B., Lewis, E., Ray, P., Hansen, J.R., Elvin, L., Ensor, K.M., Hackell, J., Siber, G., Malinoski, F., Madore, D., Chang, I., Kohberger, R., Watson, W., Austrian, R., Edwards, K. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. 2000; 19(3): 187-195.
- Bogaert, D., Groot, R., Hermans, P.W.M. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **The Lancet Infectious Diseases**. 2004; 4(3): 144-154.
- Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Knoll, M.D., Maccall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian, T. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. **The Lancet**. 2009; 374(9693): 893-902.

Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R., Walport, M.J., Botto, M. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **PNAS**. 2002; 99(26): 16669-16679.

Calbo, E., Garau, J. Factors affecting the development of systemic inflammatory response syndrome in pneumococcal infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**. 2011; 24(3): 241-247.

CDC. **Prevention of Pneumococcal Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP)**. 1997. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00047135.htm>>. Acesso em 19 mai. 2014.

CDC. **Pneumococcal Conjugate Vaccine**. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/vis/downloads/vis-pcv.pdf>>. Acesso em: 27 mai. 2014.

CDC. **Principles of Vaccination**. 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/prinvac.pdf>>. Acesso em: 04 mai. 2015.

CDC. **Pneumococcal Disease**. 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/pneumo.pdf>>. Acesso em: 19 mai. 2014.

Chen, S., Paterson, G.K., Tong, H.H., Mitchell, T.J., DeMaria T.F. Sortase A contributes to pneumococcal nasopharyngeal colonization in the chinchilla model. **FEMS Microbiology Letters**. 2005; 253(1): 151-154.

Cillóniz, C., Polverino, E., Amaro, R., Torres, A. Invasive pneumococcal disease today: epidemiology, treatment, and prevention. **Clinical Pulmonary Medicine**. 2012; 19(5): 191-198.

Cohen, J.M., Khandavilli, S., Camberlein, E., Hyams, C., Baxendale, H.E., Brown, J.S. Protective contributions against invasive *Streptococcus pneumoniae* pneumonia of antibody and Th17-cell responses to nasopharyngeal colonisation. **PLoS One**. 2011; 6(10): 1-10.

Danilova, N., Amemiya, C.T. Going adaptive: The saga of antibodies. **The Year in Evolutionary Biology**. 2009; 130-155.

Degn, S.E., Thiel, S. Humoral pattern recognition and the complement system. **Scandinavian Journal of Immunology**. 2013; 78(2): 181-193.

Dockrell, D.H., Whyte, M.K., Mitchell, T.J. Pneumococcal pneumonia - Mechanisms of infection and resolution. **CHEST Journal**. 2012; 142(2): 482-491.

Donati, C., Hiller, N.L., Tettelin, H., Muzzi, A., Croucher, N.J., Angiuoli, S.V., Oggioni, M., Dunning Hotopp, J.C., Hu, F.Z., Riley, D.R., Covacci, A., Mitchell, T.J., Bentley, S.D., Kilian, M., Ehrlich, G.D., Rappuoli, R., Moxon, E.R., Massignani, V. Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. **Genome Biology**. 2010; 11(10).

Dong, C., Flavell, R.A. Th1 and Th2 cells. **Current Opinion in Hematology**. 2001; 8(1): 47-51.

Dramsi, S., Cuot, P.T., Bierne, H. Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. **Research in Microbiology**. 2005; 156(3): 289-297.

Dunkelberger, J.R., Song, W.C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Research**. 2010; 20(1): 34-50.

Ehrnthaller, C., Ignatius, A., Gebhard, F., Huber-Lang, M. New insights of an old defense system: Structure, function, and clinical relevance of the complement system. **Molecular Medicine**. 2011; 17(3-4): 317-329.

Elios, M.M., Benagiano, M., Bella, C.D., Amedei, A. T-cell response to bacterial agents. **The Journal of Infection in Developing Countries**. 2011; 5(9): 640-645.

Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S., Boger, J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. **Journal of Virology**. 1985; 55(3): 836-839.

Ferreira, D.M., Darrieux, M., Oliveira, M.L., Leite, L.C., Miyaji, E.N. 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. **Clinical and Vaccine Immunology**. 2008; 15(3): 499-505.

Ferreira, D.M., Darrieux, M., Silva, D.A., Leite, L.C., Ferreira, J.M Jr., Ho, P.L., Miyaji, E.N., Oliveira, M.L. Characterization of protective mucosal and systemic immune responses elicited by Pneumococcal Surface Protein PspA and PspC nasal vaccines against a respiratory pneumococcal challenge in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**. 2009; 16(5): 636-645.

FIOCRUZ. **Doenças pneumocócicas: informações técnicas**. 2009. Disponível em: <<http://www.agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-pneumoc%C3%B3cicas-informa%C3%A7%C3%B5es-t%C3%A9cnicas>>. Acesso em: 22 mai. 2014.

FIOCRUZ. **Pneumonia**. 2013. Disponível em: <<http://www.agencia.fiocruz.br/pneumonia>>. Acesso em: 22 mai. 2014.

Flajnik, M. F., Pasquier, L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? **TRENDS in Immunology**. 2004; 25(12): 640-644.

Gianfaldoni, C., Maccari, S., Pancotto, L., Rossi, G., Hilleringmann, M., Pansegrau, W., Sinisi, A., Moschioni, M., Massignani, V., Rappuoli, R., Del Giudice, G., Ruggiero, P. Sortase A confers protection against *Streptococcus pneumoniae* in mice. **Infection and Immunity**. 2009; 77(7): 2957-2961.

Gourley, T.S., Wherry, E.J., Masopust, D., Ahmed, R. Generation and maintenance of immunological memory. **Seminars in Immunology**. 2004; 16(5): 323-333.

Greenbaum, J., Sidney, J., Chung, J., Brander, C., Peters, B., Sette, A. Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. **Immunogenetics**. 2011; 63(6): 325-335.

Hendrickx, A.P., Budzik, J.M., Oh, S.Y., Schneewind, O. Architects at the bacterial surface — sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. **Nature reviews**. 2011; 9(3): 166-176.

Hengen, P. N. Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*. **Trends in Biochemical Sciences**. 1995; 20(7): 285-286.

- Huang, S.S., Platt, R., Rifas-Shiman, S.L., Pelton, S.I., Goldmann, D., Finkelstein J.A. Post-PCV7 changes in colonizing pneumococcal serotypes in 16 Massachusetts communities, 2001 and 2004. **Pediatrics**. 2005; 116(3): 408-413.
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K., Brown, J.S. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. **Infection and Immunity**. 2010; 78(2): 704-715.
- Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R.A., Nordheim, A., Stunnenberg, H.G. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. **PNAS**. 1991; 88(20): 8972-8976.
- Jeannin, P., Jaillon, S., Delneste, Y. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. **Current Opinion in Immunology**. 2008; 20(5): 530-537.
- Jones, M.R., Simms, B.T., Lupa, M.M., Kogan, M.S., Mizgerd, J.P. Lung NF- κ B activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. **The Journal of Immunology**. 2005; 175(11): 7530-7035.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., Andrew, P.W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nature Reviews**. 2008; 6(4): 288-301.
- Kanamori, M.B.B., Geldhoff, M., van der Poll, T., van de Beek, D. Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. **Clinical Microbiology Reviews**. 2001; 24(3): 557-591.
- Kharat, A.S., Tomasz, A. Inactivation of the *srtA* gene affects localization of surface proteins and decreases adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to human pharyngeal cells in vitro. **Infection and Immunity**. 2003; 71(5): 2758-2765.
- Knapp, S., Leemans, J.C., Florquin, S., Branger, J., Maris, N.A., Pater, J., van Rooijen, N., van der Poll, T. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 2003; 167(2): 171-179.
- Kobayashi, S.D., Voyich, J.M., DeLeo, F.R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes and Infection**. 2003; 5(14): 1337-1344.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**. 2011; 30(1): 16-34.
- Larsen, J.E., Lund, O., Nielsen, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**. 2006; 2(2).
- Lefeber, D.J., Benaissa-Trouw, B., Vliegenthart, J.F., Kamerling, J.P., Jansen, W.T., Kraaijeveld, K., Snippe, H. Th1-directing adjuvants increase the immunogenicity of oligosaccharide-protein conjugate vaccines related to *Streptococcus pneumoniae* type 3. **Infection and Immunity**. 2003; 71(12): 6915-6920.
- Liljeqvist, S., Stahl, S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. **Journal of Biotechnology**. 1999; 73(1): 1-33.
- Lindskog, M., Rockberg, J., Uhlén, M., Sterky, F. Selection of protein epitopes for antibody production. **BioTechniques**. 2005; 38(5): 723-727.

Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Perin, J., Rudan, I., Lawn, J.E., Cousens, S., Mathers, C., Black, R.E. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. **The Lancet**. 2015; 385(9966): 430-440.

Lynch, J.P., Zhan, G.G. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**. 2010; 16(3): 217-225.

Mazmanian, S.K., Liu, G., Jensen, E.R., Lenoy, E., Schneewind, O. *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. **PNAS**. 2000; 97(10): 5510-5515.

Min, X., Zhang, X., Wang, H., Gong, Y., Li, M., Xu, W., Yin, Y., Cao, J. Protection against pneumococcal infection elicited by immunization with Glutamyl tRNA Synthetase, Polyamine Transport Protein D and Sortase A. **Vaccine**. 2012; 30(24): 3624-3623.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Informe Técnico da Vacina Pneumocócica 10- Valente (Conjugada)**. 2010. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_723_infotec.pdf>. Acesso em: 22 mai. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Novas vacinas reduzem internações por pneumonia, segundo Ministério da Saúde**. 2011. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/11/novas-vacinas-reduzem-internacoes-por-pneumonia-segundo-ministerio-da-saude>>. Acesso em: 06 mai. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (A). **Descrição da Doença**. 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/659-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/meningites/11336-descricao-da-doenca>>. Acesso em 06 mai. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (B). **Vacinas**. 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/513-sas-raiz/dapes/saude-da-crianca-e-aleitamento-materno/l1-saude-da-crianca-e-aleitamento-materno/12866-vacinas>>. Acesso em: 06 mai. 2015.

Mir, L. **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004.

Mitchell, A.M., Mitchell, T.J. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. **Clinical Microbiology and Infection**. 2010; 16(5): 411-418.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. **Microbiologia Médica**. 4 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004.

Musher, D.M. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. **Clinical Infectious Diseases**. 1992; 14(4): 801-807.

Nair, N., Vinod, V., Suresh, M.K., Vijayarajratnam, S., Biswas, L., Peethambaran, R., Vasudevan, A.K., Biswas, R. Amidase, a cell wall hydrolase, elicits protective immunity against *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2015; 77: 314-321.

Neefjes, J., Jongstra, M.L., Paul, P., Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. **Nature Reviews Immunology**. 2011; 11(12): 823-836.

Netea, M.G., Van der Meer, J.W., Suttmuller, R.P., Adema, G.J., Kullberg, B.J. From the Th1/Th2 paradigm towards a Toll-Like receptor/T-helper bias. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 2005; 49(10): 3991-3996.

Nielsen, M., Lund, O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. **BMC Bioinformatics**. 2009; 10(296).

Nothelfer, K., Sansonetti, P.J., Phalipon, A. Pathogen manipulation of B cells: the best defence is a good offence. **Nature Reviews Microbiology**. 2015; 13(3): 173-184.

Novagen. **pET System Manual**. 1998. Disponível em: <http://mikrobiologie.uni-graz.at/lehre_server/molbioSE/Presentation10/pET_System_Manual_1-41.pdf>. Acesso em: 6 mai. 2014.

Novagen. **pET System Manual**. 2003. Disponível em: <<http://lifeserv.bgu.ac.il/wb/zarivach/media/protocols/Novagen%20pET%20system%20manual.pdf>>. Acesso em: 6 mai. 2014.

Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Briles, D.E., Cook, J., Paton, J.C. Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**. 2007; 75(1): 350-357.

Parker, J.M., Guo, D., Hodges, R.S. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. **Biochemistry**. 1986; 25(19): 5425-5432.

Paterson, G.K., Mitchell, T.J. The role of *Streptococcus pneumoniae* sortase A in colonisation and pathogenesis. **Microbes and Infection**. 2006; 8(1): 145-153.

Paterson, G.K., Orihuela, C.J. Pneumococci: immunology of the innate host response. **Respirology**. 2010; 15(7): 1057-1063.

Patterson, M.J. *Streptococcus*. **Medical Microbiology**. 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston: Samuel Baron, 1996.

Pellequer, J.L., Westhof, E., Van Regenmortel, M.H. Predicting location of continuous epitopes in proteins from their primary structures. **Methods in Enzymology**. 1991; 203: 176-201.

Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**. 2011; 8(10): 785-786.

Poll, T.V., Opal, S.M. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. **The Lancet**. 2009; 374(9700): 1543-1556.

Portou, M.J., Baker, D., Abraham, D., Tsui, J. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review. **Vascular Pharmacology**. 2015.

Pulendran, B., Ahmed, R. Immunological mechanisms of vaccination. **Nature Immunology**. 2011; 12(6): 509-517.

Putte, V.B.P., Kesecioglu, J., Hendriks, J.M.H., Persy, V.P., van Marck, E., Van Schil, P.E.Y., Broe, M.E. Cellular infiltrates and injury evaluation in a rat model of warm pulmonary ischemia-reperfusion. **Critical Care**. 2005; 9(1).

- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., Lopez, R. InterProScan: protein domains identifier. **Nucleic Acids Research**. 2005; 33: 116-120.
- Ramachandra, L., Simmons, D., Harding, C.V. MHC molecules and microbial antigen processing in phagosomes. **Current Opinion Immunology**. 2009; 21(1): 98-104.
- Razavi, H.M., Wang le, F., Weicker, S., Rohan, M., Law, C., McCormack, D.G., Mehta, S. Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 2004; 170(3): 227-233.
- Rogan, D., Babiuk, L.A. Novel vaccines from biotechnology. **Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties**. 2005; 24(1): 159-174.
- Rolo, D., Ardanuy, C., Fleites, A., Martín, R., Liñares, J. Diversity of Pneumococcal Surface Protein A (PspA) among prevalent clones in Spain. **BMC Microbiology**. 2009; 9(80).
- Rudan, I., Boschi-Pinto, C., Biloglav, Z., Mulholland, K., Campbell, H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. **Bulletin of the World Health Organization**. 2008; 86(5): 408-416.
- Saha, S., Raghava, G. P. S. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics**. 2006; 65(1): 40-48.
- Saha, R., Killian, S., Donofrio, R.S. DNA Vaccines: A Mini Review. **Bentham Science**. 2011; 5(2).
- Saito, S., Nakashima, A., Shima, T., Ito, M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology**. 2010; 63(6): 601-610.
- Santos, S.R., Passadore, L.F., Takagi, E.H., Fujii, C.M., Yoshioka, C.R., Gilio, A.E., Martinez, M.B. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with invasive pneumococcal disease in Brazil before and after ten-pneumococcal conjugate vaccine implementation. **Vaccine**. 2013; 31(51): 6150-6154.
- Schneewind, O., Mihaylova-Petkov, D., Model, P. Cell wall sorting signals in surface proteins of Gram-positive bacteria. **The EMBO Journal**. 1993; 12(12): 4803-4811.
- Schutze, G.E., Kaplan, S.L., Jacobs, R.F. Resistant pneumococcus: A worldwide problem. **Infection**. 1994; 22(4): 233-237.
- Shin, S., Brodsky, I.E. The inflammasome: Learning from bacterial evasion strategies. **Seminars in Immunology**. 2015; 27(2): 102-110.
- Siegrist, C. A. **Vaccine immunology**. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/documents/Elsevier_Vaccine_immunology.pdf>. Acesso em: 04 mai. 2015.
- Sonnhammer, E.L., von Heijne, G., Krogh, A. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. **Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol**. 1998; 175-182.
- Spirig, T., Weiner, E.M., Clubb, R.T. Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**. 2011; 82(5): 1044-1059.

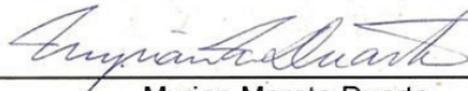
- Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Arned, 2005.
- Trinchieri, G., Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. **Nature Reviews Immunology**. 2007; 7(3): 179-190.
- Velasco A.E., Verheul, A.F., Verhoef, J., Snippe, H. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence factors, pathogenesis, and vaccines. **Microbiological Reviews**. 1995; 59(4): 591-603.
- Vespa, G., Constenla, D.O., Pepe, C., Safadi, M.A., Berezin, E., Moraes, J.C., Campos, C.A., Araujo, D.V., Andrade A.L. Estimating the cost-effectiveness of pneumococcal conjugate vaccination in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Publica**. 2009; 26(6): 518-528.
- Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., Ploegh, H.L. The known unknowns of antigen processing and presentation. **Nature Reviews Immunology**. 2008; 8(8): 607-618.
- Wang, L. F., Yu, M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. **Current Drug Targets**. 2004; 5(1): 1-15.
- Weintraub, A. Immunology of bacterial polysaccharide antigens. **Carbohydrate Research**. 2003; 338(23): 2539-2547.
- Widmann, M., Clairo, M., Dippon, J., Pleiss, J. Analysis of the distribution of functionally relevant rare codons. **BMC Genomics**. 2008; 9.
- Wu, H.Y., Nahm, M.H., Guo, Y.; Russell, M.W., Briles, D.E. Intranasal immunization of mice with PspA (Pneumococcal Surface Protein A) can prevent intranasal carriage, pulmonary infection, and sepsis with *Streptococcus pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases**. 1997; 175(4): 839-846.
- Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jönsson, G., Tay, L.S., Hyams, C., Baxendale, H.E., Goldblatt, F., Botto, M., Brown, J.S. Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. **Infection and Immunity**. 2008; 76(8): 3761-3770.

ANEXO 1
Comissão de ética no uso de animais

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o **Protocolo nº 060/2013**, relativo ao projeto intitulado “**Proteínas sortase A e pav A na forma de proteína recombinante ou vacina de DNA para o desenvolvimento de uma vacina contra o *Streptococcus pneumoniae***”, que tem como responsável **Sophie Yvette Leclercq**, está de acordo com Princípios Éticos da experimentação animal adotados pela **Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA/Funed)**, tendo sido **APROVADO** no dia **07/02/2014**.

Belo Horizonte, 07 de fevereiro de 2014.



Myrian Morato Duarte
Coordenadora da CEUA/Funed

Obs.: a validade deste parecer é de 02 anos a partir da data de sua expedição.

ANEXO 2

**Alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos da
proteína SrtA de *Streptococcus pneumoniae***

670-6B ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
215/07-HEM ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
INV104 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
P1031 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
JJA ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
D39 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
R6 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
Hungary19A-6 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
70585 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
AP200 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
INV200 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
ATCC ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
SPN994039 ATGTCTCAAAAAAATAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATTTGCTGACAAATATC 60
SPN994038 ATGTCTCAAAAAAATAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATTTGCTGACAAATATC 60
SPN034183 ATGTCTCAAAAAAATAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATTTGCTGACAAATATC 60
SPN034156 ATGTCTCAAAAAAATAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATTTGCTGACAAATATC 60
OXC141 ATGTCTCAAAAAAATAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATTTGCTGACAAATATC 60
TCH8431/19A ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
SPNA45 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
gamPNI0373 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
G54 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
Taiwan19F-14 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57
A026 ATGTCTCAAAAAA---TAATAAAAAGAAAAACAAGCGAAAAATCTGCTGACAAATATC 57

670-6B CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
215/07-HEM CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
INV104 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
P1031 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
JJA CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
D39 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
R6 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
Hungary19A-6 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
70585 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
AP200 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
INV200 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
ATCC CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
SPN994039 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 120
SPN994038 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 120
SPN034183 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 120
SPN034156 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 120
OXC141 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 120
TCH8431/19A CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
SPNA45 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
gamPNI0373 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
G54 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
Taiwan19F-14 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117
A026 CTAGCAGGATTTCTGATATTACTGTCACTGGCTTTGATTTTAAATACTCAAATTCGAAAT 117

670-6B ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
215/07-HEM ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
INV104 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
P1031 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
JJA ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
D39 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
R6 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
Hungary19A-6 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
70585 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
AP200 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
INV200 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
ATCC ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
SPN994039 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 180
SPN994038 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 180
SPN034183 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 180
SPN034156 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 180
OXC141 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 180
TCH8431/19A ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
SPNA45 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
gamPNI0373 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
G54 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
Taiwan19F-14 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177
A026 ATTTTCATAGTCTGGAATACCAATAAGTATCAAGTTAGCCAGGTATCAAAAAGAAAAATTA 177

670-6B GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
215/07-HEM GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
INV104 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
P1031 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
JJA GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
D39 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
R6 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
Hungary19A-6 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
70585 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
AP200 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
INV200 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
ATCC GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
SPN994039 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 240
SPN994038 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 240
SPN034183 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 240
SPN034156 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 240
OXC141 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 240
TCH8431/19A GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
SPNA45 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
gamPNI0373 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
G54 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
Taiwan19F-14 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237
A026 GAAGAAAATCAGGATACAGAAGGCCAATTTTGACTTTGATTCTGTCAAAGCTATCTCTTCG 237

670-6B GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGAATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
215/07-HEM GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGAATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
INV104 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
P1031 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
JJA GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
D39 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
R6 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
Hungary19A-6 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
70585 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
AP200 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
INV200 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
ATCC GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
SPN994039 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 300
SPN994038 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 300
SPN034183 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 300
SPN034156 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 300
OXC141 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 300
TCH8431/19A GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
SPNA45 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
gamPNI0373 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
G54 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
Taiwan19F-14 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297
A026 GAAGCTGTTCTAAGTCTCAATGGGATGCTCAAAAATTACCAGTTATTGGGGGAATTGCA 297

670-6B ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
215/07-HEM ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
INV104 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
P1031 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
JJA ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
D39 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
R6 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
Hungary19A-6 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
70585 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
AP200 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
INV200 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
ATCC ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
SPN994039 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 360
SPN994038 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 360
SPN034183 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 360
SPN034156 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 360
OXC141 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 360
TCH8431/19A ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
SPNA45 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
gamPNI0373 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
G54 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
Taiwan19F-14 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357
A026 ATTCCTGAATTGGAAATGAATTTGCCGATTTTAAAGGACTTGATAATGTTAATCTCTTC 357

670-6B TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
215/07-HEM TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
INV104 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
P1031 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
JJA TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
D39 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
R6 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
Hungary19A-6 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
70585 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
AP200 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
INV200 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
ATCC TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
SPN994039 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 420
SPN994038 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 420
SPN034183 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 420
SPN034156 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 420
OXC141 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 420
TCH8431/19A TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
SPNA45 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
gamPNI0373 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
G54 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
Taiwan19F-14 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417
A026 TACGGAGCTGGTACAATGAAACGCGAGCAAGTAATGGGAGAAGGAAATTATAGTCTAGCT 417

670-6B AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
215/07-HEM AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
INV104 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
P1031 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
JJA AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
D39 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
R6 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
Hungary19A-6 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
70585 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
AP200 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
INV200 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
ATCC AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
SPN994039 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 480
SPN994038 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 480
SPN034183 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 480
SPN034156 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 480
OXC141 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 480
TCH8431/19A AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
SPNA45 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
gamPNI0373 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
G54 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
Taiwan19F-14 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477
A026 AGTCACCATATCTTTGGTGTGATAATGCTAATAAAAATGTTATTTTCTCCTTTAGATAAT 477

670-6B GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
215/07-HEM GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
INV104 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
P1031 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
JJA GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
D39 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
R6 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
Hungary19A-6 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
70585 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
AP200 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
INV200 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
ATCC GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
SPN994039 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 540
SPN994038 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 540
SPN034183 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 540
SPN034156 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 540
OXC141 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 540
TCH8431/19A GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
SPNA45 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
gamPNI0373 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
G54 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
Taiwan19F-14 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537
A026 GCTAAAAATGGCATGAAGATTTATCTAACCGATAAAAAATAAAGTTTATACTTATGAAATA 537

670-6B CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
215/07-HEM CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
INV104 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
P1031 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
JJA CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
D39 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
R6 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
Hungary19A-6 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
70585 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
AP200 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
INV200 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
ATCC CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
SPN994039 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 600
SPN994038 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 600
SPN034183 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 600
SPN034156 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 600
OXC141 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 600
TCH8431/19A CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
SPNA45 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
gamPNI0373 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
G54 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
Taiwan19F-14 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597
A026 CGTGAAGTCAAACGTGTGACACCGGATCGTGTGATGAAGTTGATGATAGAGATGGGGTC 597

670-6B AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
215/07-HEM AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
INV104 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
P1031 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
JJA AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
D39 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
R6 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
Hungary19A-6 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
70585 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
AP200 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
INV200 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
ATCC AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
SPN994039 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 660
SPN994038 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 660
SPN034183 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 660
SPN034156 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 660
OXC141 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 660
TCH8431/19A AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
SPNA45 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
gamPNI0373 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
G54 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
Taiwan19F-14 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657
A026 AATGAAATCACATTAGTAACCTGTGAAGACCTTGCTGCTACAGAACGTATTATTGTCAAA 657

670-6B GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
215/07-HEM GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
INV104 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
P1031 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
JJA GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
D39 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
R6 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
Hungary19A-6 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
70585 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
AP200 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
INV200 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
ATCC GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTGATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
SPN994039 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 720
SPN994038 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 720
SPN034183 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 720
SPN034156 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 720
OXC141 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 720
TCH8431/19A GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
SPNA45 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
gamPNI0373 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
G54 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
Taiwan19F-14 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 717
A026 GGTGATTTGAAAGAAACAAAAGATTATTCACAAACATCTAATGAAATCCTAACAGCTTTC 717

670-6B	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
215/07-HEM	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
INV104	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
P1031	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
JJA	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
D39	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
R6	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
Hungary19A-6	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
70585	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
AP200	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
INV200	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
ATCC	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
SPN994039	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	747
SPN994038	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	747
SPN034183	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	747
SPN034156	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	747
OXC141	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	747
TCH8431/19A	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
SPNA45	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
gamPNI0373	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
G54	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
Taiwan19F-14	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744
A026	AATCAACCATATAAACAATTTTATTAA	744

Figura S1: Alinhamento das seqüências nucleotídicas do gene *srtA* de *S. pneumoniae*. A seqüência em destaque corresponde a linhagem utilizada neste trabalho. (*) indica máxima identidade entre todas as seqüências e a ausência indica bases diferentes entre as seqüências alinhadas.

TCH8431/19A MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 SPNA45 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 gamPNI0373 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 G54 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 Taiwan19F-14 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 A026 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 ATCC MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 D39 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 JJA MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 Hungary19A-6 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 P1031 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 70585 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 AP200 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 INV104 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 INV200 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 R6 MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 670-6B MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
215/07-HEM MSQK-NNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 59
 SPN994039 MSQKNNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 60
 SPN994038 MSQKNNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 60
 SPN034183 MSQKNNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 60
 SPN034156 MSQKNNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 60
 OXC141 MSQKNNKKKNKRKNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQVSQVSKEKL 60
 **** *

TCH8431/19A EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 SPNA45 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 gamPNI0373 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 G54 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 Taiwan19F-14 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 A026 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 ATCC EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 D39 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 JJA EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 Hungary19A-6 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 P1031 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 70585 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 AP200 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 INV104 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 INV200 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 R6 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 670-6B EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
215/07-HEM EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 119
 SPN994039 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 120
 SPN994038 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 120
 SPN034183 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 120
 SPN034156 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 120
 OXC141 EENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWDAQKLPVIGGIAIPELEMNLPPIFKGLDNVNL 120

TCH8431/19A	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
SPNA45	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
gamPNI0373	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
G54	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
Taiwan19F-14	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
A026	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
ATCC	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
D39	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
JJA	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
Hungary19A-6	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
P1031	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
70585	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
AP200	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
INV104	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
INV200	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
R6	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
670-6B	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
215/07-HEM	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	179
SPN994039	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	180
SPN994038	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	180
SPN034183	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	180
SPN034156	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	180
OXC141	YGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYE I	180

TCH8431/19A	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
SPNA45	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
gamPNI0373	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
G54	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
Taiwan19F-14	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
A026	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
ATCC	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
D39	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
JJA	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
Hungary19A-6	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
P1031	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
70585	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
AP200	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
INV104	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
INV200	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
R6	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
670-6B	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
215/07-HEM	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	239
SPN994039	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	240
SPN994038	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	240
SPN034183	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	240
SPN034156	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	240
OXC141	REVKRVT PDRVDEVDDR DGVNEI TLVTCEDLAATERI IVKGLKETKDYSQTSNEILTAF	240

TCH8431/19A	NQPYKQFY	247
SPNA45	NQPYKQFY	247
gamPNI0373	NQPYKQFY	247
G54	NQPYKQFY	247
Taiwan19F-14	NQPYKQFY	247
A026	NQPYKQFY	247
ATCC	NQPYKQFY	247
D39	NQPYKQFY	247
JJA	NQPYKQFY	247
Hungary19A-6	NQPYKQFY	247
P1031	NQPYKQFY	247
70585	NQPYKQFY	247
AP200	NQPYKQFY	247
INV104	NQPYKQFY	247
INV200	NQPYKQFY	247
R6	NQPYKQFY	247
670-6B	NQPYKQFY	247
215/07-HEM	NQPYKQFY	247
SPN994039	NQPYKQFY	248
SPN994038	NQPYKQFY	248
SPN034183	NQPYKQFY	248
SPN034156	NQPYKQFY	248
OXC141	NQPYKQFY	248

Figura S2: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína SrtA de *S. pneumoniae*. A seqüência em destaque corresponde a linhagem utilizada neste trabalho. (*) indica máxima identidade entre todas as seqüências, (:) indica que os resíduos de aminoácidos são fortemente semelhantes e o espaço indica que são diferentes em todos os aspectos.

ANEXO 3

**Alinhamento da proteína SrtA entre *S. pneumoniae* e outras
bactérias Gram-positivas**

Streptococcus_pneumoniae	MSQKNNKKKKNRKNLLTNI LAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQ	50
Streptococcus_agalactiae	--MRNKKKSHGFNFVRWLLVLLIIVGLALVFNKPIRNAFIAHQSNHYQ	48
	:*:*. : * : : * . :*:*. :*:*. :*:*. :*:*. :*:*. :*:*. :*:*	
Streptococcus_pneumoniae	VSQVSKEKLEENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWNAQKLPVIGGIAI	100
Streptococcus_agalactiae	ISRVSKKTEKNKSKTSYDFSSVKSISTESILSAQTKSHNLPVIGGIAI	98
	:*:*. :*:*. :*:*. :*:*. :*:*. :*:*. :*:*. :*:*. :*:*. :*:*	
Streptococcus_pneumoniae	PELEMNLP I FKGLDNVNL FYGAGTMKREQVMG-EGNYSLASHHIFGVDNA	149
Streptococcus_agalactiae	PDVEINLP I FKGLGNT ELSYGAGTMKENQIMGGPNNYALASHHVFGLTGS	148
	* : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Streptococcus_pneumoniae	NKMLFSPLDNAKNGMKIYLT DKNKVYTYEIREVKRVTPDRVDEVDDR DGV	199
Streptococcus_agalactiae	SKMLFSPL EHA KGMKVYLT DKS K VYTYTITEISKVTP EHV EIDDT PGK	198
	. * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Streptococcus_pneumoniae	NEITLVTCEDLAATERI I VKGDLKETKDYSQTSDEILTA FNQPYKQFY-	247
Streptococcus_agalactiae	SQTLVTCTDPEATERI I VHA E LK T G E F S T A D E S I L K A F S K K Y N Q I N L	247
	. : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Figura S3: Alinhamento da SrtA de *S. pneumoniae* com *S. agalactiae*. (*) indica máxima identidade entre as sequências, (:) indica que os resíduos de aminoácidos são fortemente semelhantes, (.) indica que os resíduos são fracamente semelhantes e espaço indica que são diferentes em todos os aspectos.

Streptococcus_pneumoniae	MSQKNNKKKKNRKNLLTNI LAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQ	50
Streptococcus_pyogenes	MVKKQKRRIKIKSMWARLLIAVLLILGLALLFNKPIRNITLIARNSNKYQ	50
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Streptococcus_pneumoniae	VSQVSKEKLEENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWNAQKLPVIGGIAI	100
Streptococcus_pyogenes	VTRVSKKQIKKNKEAKSTFDQAVEPVSTESVLQAQMAAQQLPVIGGIAI	100
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Streptococcus_pneumoniae	PELEMNLP I FKGLDNVNL FYGAGTMKREQVMG-EGNYSLASHHIFGVDNA	149
Streptococcus_pyogenes	PELGINLP I FKGLGNT ELYGAGTMKEEQVMGGENNYSLASHHIFGITGS	150
	* * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Streptococcus_pneumoniae	NKMLFSPLDNAKNGMKIYLT DKNKVYTYEIREVKRVTPDRVDEVDDR DGV	199
Streptococcus_pyogenes	SQMLFSPLERAQNGMSIYLT DKEKIY EYI I KDVFTVAPERVDVIDDTAGL	200
	. : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
Streptococcus_pneumoniae	NEITLVTCEDLAATERI I VKGDLKETKDYSQTSDEILTA FNQPYKQFY-	247
Streptococcus_pyogenes	KEVTLVTCTDIEATERI I VKGELKTEYDFDKAPADVLKAFNHSYNQVST	249
	. : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	

Figura S4: Alinhamento da SrtA de *S. pneumoniae* com *S. pyogenes*. (*) indica máxima identidade entre as sequências, (:) indica que os resíduos de aminoácidos são fortemente semelhantes, (.) indica que os resíduos são fracamente semelhantes e espaço indica que são diferentes em todos os aspectos.

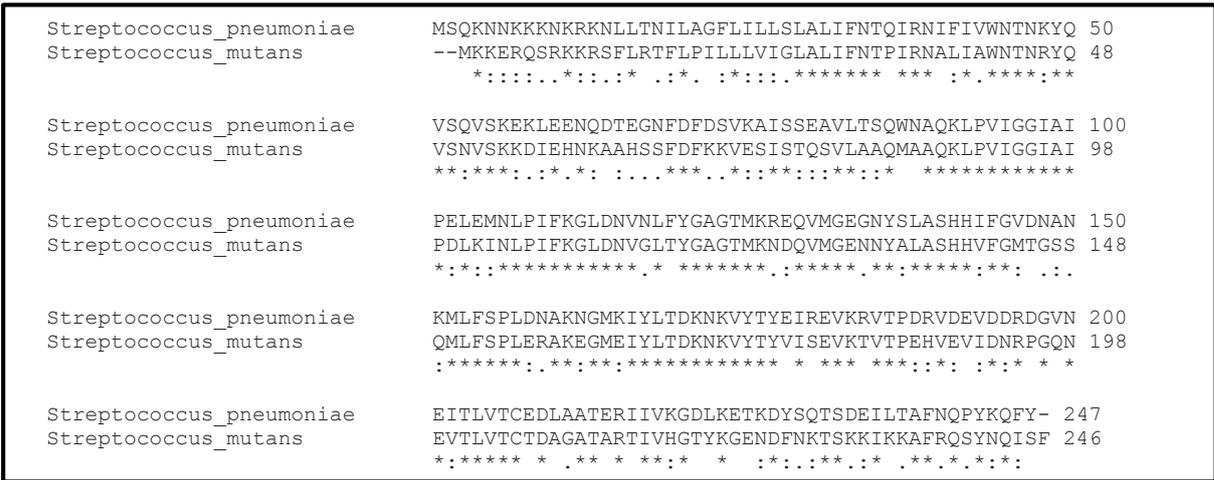


Figura S5: Alinhamento da SrtA de *S. pneumoniae* com *S. mutans*. (*) indica máxima identidade entre as sequências, (:) indica que os resíduos de aminoácidos são fortemente semelhantes, (.) indica que os resíduos são fracamente semelhantes e espaço indica que são diferentes em todos os aspectos.

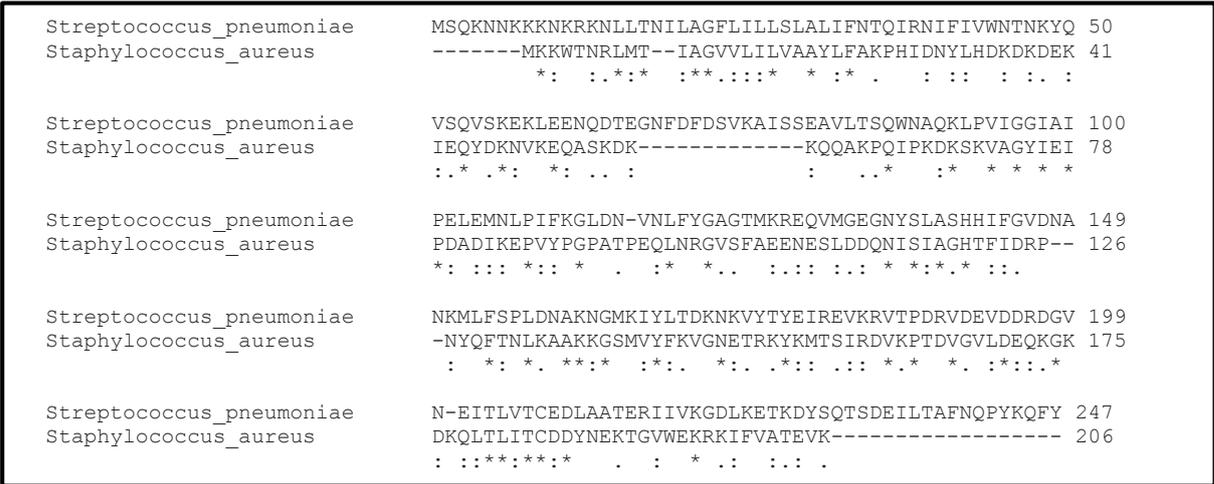


Figura S6: Alinhamento da SrtA de *S. pneumoniae* com *S. aureus*. (*) indica máxima identidade entre as sequências, (:) indica que os resíduos de aminoácidos são fortemente semelhantes, (.) indica que os resíduos são fracamente semelhantes e espaço indica que são diferentes em todos os aspectos.

Streptococcus_pneumoniae	MSQKNNKKKRNKRNLLTN----ILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIV--- 43
Staphylococcus_epidermidis	MSARNRKLNTMVNKILVNSYIVLTFCLIIIGLLFFHKPIISHFIAPHK 50 ** :*: * * . * : :*: * :*: * *: :. * . ** .
Streptococcus_pneumoniae	-----WNTNKYQVSQVSKEKLEENQDTEGNFDFDSVKAISS 79
Staphylococcus_epidermidis	MEQTYKNLNNGLKFKPNSYVDNIKYLDSDKSKLDSNINYNFKSVKPINL 100 : :. * . * . : . : : : * : * : * . * . * . * .
Streptococcus_pneumoniae	EAVLTSQWNAQKLPVIGGIAIPELEMNLPFIKGLDNVNLFGAGTMKREQ 129
Staphylococcus_epidermidis	LDIKDAKLDKR--YVRGQIVIPISINLDPILQGVSNLWFGASTMKPNQ 148 : : : : : * * * . * . : : : : * : * : * . * . * . * . * .
Streptococcus_pneumoniae	VMGEGNYSLASHHIFGVDNANKMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYEI 179
Staphylococcus_epidermidis	KLGEQYALAGHTTD----NSLLFTPLHHIKYGDSIYLTDSVNIYIYKT 194 : * * * : * . * . : : * : * : * . * . * . * . * . * . * .
Streptococcus_pneumoniae	REVKRVTPDRVDEVDVDRDGVNEITLVTCEDLAATERIIVKGLKDKETKDY 229
Staphylococcus_epidermidis	DSIKIVSPNRGEVIRDDNNKLLTLVTCSDVKGTNRLLIQAFIKKELKLS 244 . : * * : * : * : * * . : : * * * . * . : * : * : * : : : . : . * .
Streptococcus_pneumoniae	QTSDEILTAFNQPYKQFY 247
Staphylococcus_epidermidis	QGNIGIFKL----- 253 * . * : .

Figura S7: Alinhamento da SrtA de *S. pneumoniae* com *S. epidermidis*. (*) indica máxima identidade entre as sequências, (:) indica que os resíduos de aminoácidos são fortemente semelhantes, (.) indica que os resíduos são fracamente semelhantes e espaço indica que são diferentes em todos os aspectos.

Streptococcus_pneumoniae	MSQKNNKKKRNKRNLLTNILAGFLILLSLALIFNTQIRNIFIVWNTNKYQ 50
Listeria_monocytogenes	-----MLKKTIAIILIIIGLLIFSPFIKNGIVKYMGSGET 36 : * : : * : : : : * * * . * * : : : : :
Streptococcus_pneumoniae	VSQVSKEKLEENQDTEGNFDFDSVKAISSEAVLTSQWNAQKLPVIGGIAI 100
Listeria_monocytogenes	IEQYKASDIKKNNEKDATFDFESVQLPSMTSVIKGAANYDKDAVVGSI 86 : . * . . : : : * : : : . * * * : * : * : * . * : * . * . * .
Streptococcus_pneumoniae	PELEMNLPFIKGLDNVNLFGAGTMKREQVMGEGNYSLASHHIFGVDNAN 150
Listeria_monocytogenes	PSVDVNLVFKGTNTANLLAGATTMRSDQVMGKGNYP LAGHMR---DE 132 * : : : * * : * * . : . * * : * * * : * * * : * * * : * . * . * . * .
Streptococcus_pneumoniae	KMLFSPLDNAKNGMKIYLTDKNKVYTYEIREVKRVTPDRVDEVDVDRDGVN 200
Listeria_monocytogenes	SMLFGPIMKVKKGDKIYLTDLNLYEYTVTETKTIDETEVSVIDDTKDA- 181 . * * . * : : . * : * * * * : : * * : * . * : . * . * * . . .
Streptococcus_pneumoniae	EITLVTCED-LAATERIIVKGLKDKETKDYQTSDEILTAFNQPYKQFY 247
Listeria_monocytogenes	RITLITCDKPTETTKRFVAVGELEKTEKLTKELENKYFPSK----- 222 . * * : * : . : * : : . * : : * : . : : : . : .

Figura S8: Alinhamento da SrtA de *S. pneumoniae* com *L. monocytogenes*. (*) indica máxima identidade entre as sequências, (:) indica que os resíduos de aminoácidos são fortemente semelhantes, (.) indica que os resíduos são fracamente semelhantes e espaço indica que são diferentes em todos os aspectos.