

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



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

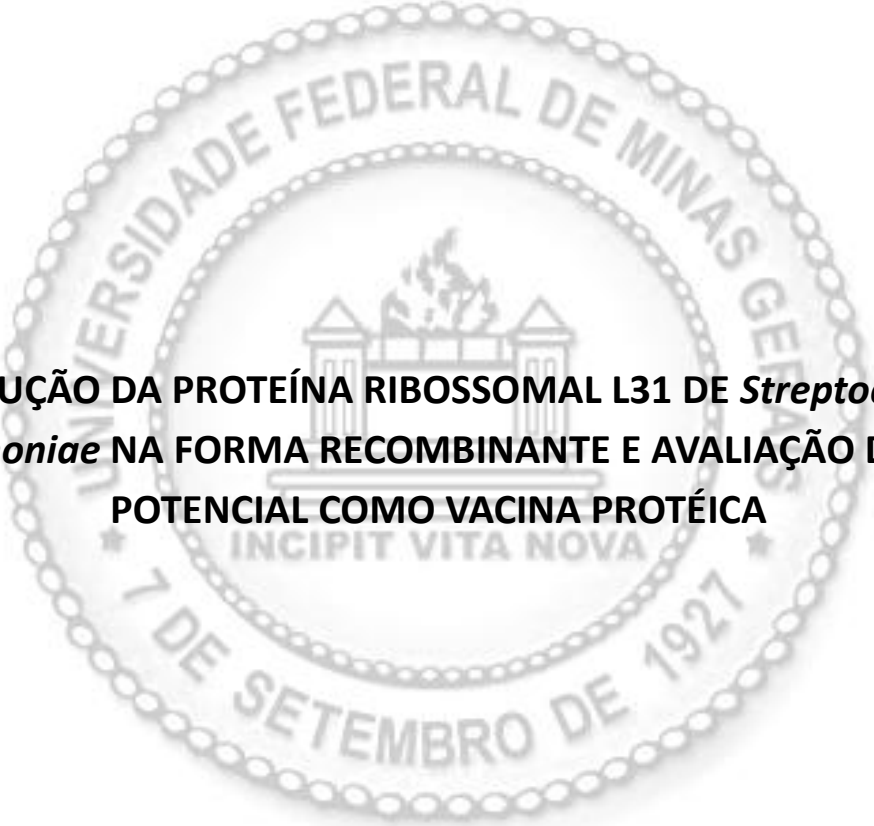
PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31 DE *Streptococcus pneumoniae* NA FORMA RECOMBINANTE E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL COMO VACINA PROTÉICA

ORIENTADO: **Fabricio Fernandes de Souza**
ORIENTADOR: **Prof. Dr. Anderson Miyoshi**
CO-ORIENTADORA: **Dra. Sophie Yvette Leclercq**

BELO HORIZONTE

Fevereiro 2013

Fabricio Fernandes de Souza



PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31 DE *Streptococcus pneumoniae* NA FORMA RECOMBINANTE E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL COMO VACINA PROTÉICA

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Anderson Miyoshi

CO-ORIENTADORA: Dra. Sophie Yvette Leclercq

BELO HORIZONTE

Fevereiro 2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor, confiança e apoio. Vocês são os principais responsáveis por eu ter chegado até aqui.

A minha namorada Ana Carolina, uma pessoa mais do que especial. Obrigado pelo amor, apoio e compreensão ao longo desses anos. Sem você tudo seria mais difícil... obrigado por existir na minha vida!

Aos meus amigos e familiares pelo apoio, carinho e torcida.

À minha orientadora Dr^a. Sophie pela oportunidade, confiança e incentivo. Sua orientação foi muito importante na minha formação profissional e também pessoal.

Ao professor Dr. Anderson Miyoshi pela oportunidade e confiança ao ter me recebido no departamento de Genética.

Aos amigos do Laboratório de Inovação Biotecnológica, Janete, Tatiana, Mariana, Jéssica, Thais e Débora por todos os momentos que passamos ao longo desses últimos anos, sempre com seriedade e responsabilidade, mas também com uma pitadinha de humor. Obrigado pela imensa ajuda, vocês foram parte importante para realização desse trabalho.

A Patrícia Cota pela amizade, conversas e apoio, mesmo não estando mais no Laboratório.

A Ana Valentim... o que seria das minhas purificações sem você?

A todos os amigos, colegas e profissionais da FUNED que participaram direta ou indiretamente desse trabalho.

Aos professores e colegas do curso de Pós-graduação em Genética.

Por fim, obrigado a todos que de alguma forma participaram da realização desse trabalho...

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
1.1 O MICRORGANISMO: <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
1.2 TRATAMENTO E PROFILAXIA	4
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	5
1.4 HISTÓRICO DAS VACINAS UTILIZADAS CONTRA <i>S. pneumoniae</i>	6
1.5 VACINAS BASEADAS EM ANTÍGENOS PROTÉICOS CONSERVADOS	8
1.6 A BIOINFORMÁTICA NA BUSCA DE ANTÍGENOS PROTÉICOS.....	9
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
3.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31	14
3.3 CLONAGEM DO GENE L31 NO SISTEMA pET-21a	15
3.3.1 Digestão enzimática e purificação do gene L31 e do plasmídeo pET-21a	16
3.3.2 Desfosforilação do plasmídeo pET-21a	17
3.3.3 Reação de ligação do plasmídeo pET-21a ao gene L31	17
3.3.4 Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i> da linhagem NM522	18
3.3.5 Transformação de <i>E. coli</i> NM522 competente com plasmídeo pET21-a/L31	18
3.3.6 PCR de colônias para seleção dos clones positivos	18
3.3.7 Reação de sequenciamento	19
3.3.8 Transformação do plasmídeo pET-21a/L31 em <i>E. coli</i> da linhagem BL21(DE3) ..	19
3.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31 RECOMBINANTE EM BL21(DE3).....	19
3.4.1 Determinação da solubilidade da proteína ribossomal L31 recombinante	20
3.4.2 Solubilização da proteína ribossomal L31 recombinante com Uréia.....	21
3.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31 RECOMBINANTE	21

3.5.1 Western blot para confirmação da presença da cauda de histidina e da imunogenicidade da proteína recombinante L31.....	22
3.6 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	22
3.6.1 Avaliação da resposta humoral dos camundongos	24
3.6.2 Avaliação da resposta celular dos camundongos.....	24
3.6.3 Desafio e determinação da bacteremia.....	25
4 RESULTADOS	26
4.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31	26
4.2 CLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31.....	26
4.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31 RECOMBINANTE.....	29
4.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31 RECOMBINANTE	30
4.5 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DA CAUDA DE HISTIDINA E DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA L31 PURIFICADA.....	32
4.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....	33
4.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR	36
4.8 AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA E SOBREVIVÊNCIA DOS CAMUNDONGOS DESAFIADOS COM <i>S. pneumoniae</i>	37
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	44
6.1 CONCLUSÕES	44
6.2 PERSPECTIVAS.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura do pneumococo	4
Figura 2. Distribuição global de mortes entre crianças menores de cinco anos	6
Figura 3. Esquema das duas estratégias de bioinformática	11
Figura 4. Mapa e sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pET-21a.....	16
Figura 5. Esquema do sistema de indução de expressão em BL21 com plasmídeo pET	20
Figura 6. Análise da amplificação do gene que codifica a proteína ribossomal L31	26
Figura 7. Análise da digestão enzimática do plasmídeo pET-21a com as enzimas <i>Nde I</i> e <i>Xho I</i>	27
Figura 8. Análise da PCR de colônias para verificação da presença do gene da proteína L31	28
Figura 9. Análise do sequenciamento do gene da proteína L31	28
Figura 10. Alinhamento da sequência nucleotídica do gene L31 no programa ClustalW2	29
Figura 11. Análise da cinética de expressão da proteína L31 do clone1	30
Figura 12. Análise da determinação da solubilidade e solubilização com uréia em diferentes concentrações da proteína L31 expressa	31
Figura 13. Análise da purificação da proteína L31	32
Figura 14. Western Blot para confirmação da identidade da proteína L31 purificada..	33
Figura 15. Western Blot para verificação da imunogenicidade da proteína L31 purificada	33
Figura 16. Níveis de anticorpos IgG anti L31 do soro de camundongos do experimento 1 após três imunizações	34

Figura 17. Titulação de anticorpos IgG1 anti L31 do soro de camundongos do experimento 2 após três imunizações.....	35
Figura 18. Níveis das subclasses de anticorpos IgG do soro de camundongos do experimento 2 após três imunizações	35
Figura 19. Análise dos níveis de produção de citocinas, comparando o grupo Controle e o Freund	36
Figura 20. Análise da bacteremia após dezoito horas do desafio.....	37
Figura 21. Análise da sobrevivência dos camundongos desafiados com <i>S. pneumoniae</i> .	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores utilizados na amplificação do gene L31	15
Tabela 2: Condições para digestão enzimática	17
Tabela 3: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS

BD	–	Biosciences
CaCl₂	–	Cloreto de Cálcio
CBA	–	Cytometric Bead Array
CETEA	–	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEUA	–	Comitê de Ética no Uso de Animais
ClpP	–	Protease caseinolítica
CO₂	–	Dióxido de Carbono
DAB	–	Diaminobenzidina
DL₅₀	–	Dose letal capaz de matar 50% dos animais
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
ddNTP	–	Didesoxirribonucleotídeo trifosfatado
dNTPs	–	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO₆₀₀	–	Densidade óptica a 600 nanômetros
DPI	–	Doença pneumocócica invasiva
EDTA	–	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	–	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<i>E. coli</i>	–	<i>Escherichia coli</i>
FUNED	–	Fundação Ezequiel Dias
H₂O₂	–	Peróxido de Hidrogênio
H₂O	–	Água
HCl	–	Ácido Clorídrico
IFN-γ	–	Interferon gama
IgG	–	Imunoglobulina G
IL-2	–	Interleucina 2
IL-4	–	Interleucina 4
IL-5	–	Interleucina 5
IPTG	–	β-D-isopropil-tiogalactopiranosídeo
kDa	–	Quilo Dalton
KH₂PO₄	–	Hidrogenofosfato de Potássio
LB	–	Meio Luria Bertani para cultivo de células
M	–	Molar
mA	–	Miliamperes
MgCl₂	–	Cloreto de magnésio
MHC	–	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	–	Mililitro

mM	–	Millimolar
NaCl	–	Cloreto de sódio
Na₂CO₃	–	Carbonato de sódio
NaHCO₃	–	Bicarbonato de sódio
Na₂HPO₄	–	Hidrogenofosfato dissódico
NCBI	–	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	–	Nanograma
nm	–	Nanômetro
ORF	–	Fase de leitura aberta
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
OPD	–	o – phenylenediamine dihydrochloride
PBS	–	Tampão fosfato salina
PBST	–	Tampão fosfato salina – Tween 20
PCR	–	Polymerase Chain Reaction
pb	–	Pares de Base
PCV	–	Pneumococcal Conjugate Vaccine
pH	–	Potencial hidrogeniônico
PhtB	–	Proteína tríade de histidina B
PhtE	–	Proteína tríade de histidina E
pMoles	–	Picomoles
PNI	–	Programa Nacional de Imunizações
PPV	–	Pneumococcal Polysaccharide Vaccine
PsaA	–	Adesina de superfície pneumocócica A
PspA	–	Proteína de superfície pneumocócica A
PspC	–	Proteína de superfície pneumocócica C
q.s.p	–	Quantidade suficiente para
rpm	–	Rotações por minuto
RPMI	–	Instituto Roswell Park Memorial
SAP	–	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SDS	–	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	–	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SFB	–	Soro Fetal Bovino
<i>S. pneumoniae</i>	–	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SrtA	–	Sortase A
Taq polymerase	–	DNA polimerase termoestável de <i>Thermus aquaticus</i>
TNF-α	–	Fator de necrose tumoral alfa
Tris	–	Tris(hidroximetil)aminometano

UFC	–	Unidade formadora de colônia
UFMG	–	Universidade Federal de Minas Gerais
V	–	Volts
X	–	Vezes
W	–	Watts
%	–	Porcentagem
°C	–	Grau Celsius
µL	–	Microlitro
µg	–	Microgramas

RESUMO

Introdução. O *Streptococcus pneumoniae*, mais conhecido como pneumococo, é uma bactéria gram-positiva e encapsulada, possuindo mais de 90 sorotipos conhecidos. O pneumococo causa doenças como: pneumonia, meningite, sepse e otite média aguda. Embora existam vacinas disponíveis, todas são baseadas em antígenos polissacarídicos (conjugadas ou não), tornando-as de alto custo e baixa cobertura. **Objetivo.** O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial imunogênico e a capacidade protetora da proteína ribossomal L31 recombinante em modelo murino, visando à produção de uma vacina a base de antígenos protéicos conservados. **Metodologia.** A escolha da proteína ribossomal L31, se deu a partir de um estudo *in silico* realizado pelo Serviço de Biologia Molecular e Bioinformática da FUNED, onde foi feita a predição de possíveis antígenos protéicos candidatos a vacina, tendo como principais características, a exposição na superfície celular, a conservação entre os vários sorotipos e a possível ação como fator de virulência. Assim, o gene que codifica a proteína ribossomal L31 foi amplificado do genoma de *S. pneumoniae*, clonado no vetor de expressão pET-21a e conferido por sequenciamento de DNA. A proteína expressa em *Escherichia coli* foi purificada por cromatografia de afinidade e sua imunogenicidade foi avaliada por Western blot, utilizando-se soros de pacientes com diagnóstico de meningite e soro de coelho imunizado com a proteína L31. Quatro experimentos distintos foram realizados envolvendo a imunização de camundongos com a proteína ribossomal L31 recombinante, a fim de avaliar: (1) a resposta humoral, comparando as vias de administração; (2) a resposta humoral comparando adjuvantes; (3) a produção de citocinas; e (4) bacteremia e a sobrevivência após o desafio com *S. Pneumoniae*. **Resultados.** O gene foi amplificado e clonado com sucesso, sendo confirmado pelo sequenciamento. A expressão e purificação da proteína L31 foram realizadas com êxito, apresentando um bom rendimento após a purificação. A proteína L31 purificada mostrou-se imunogênica e foi capaz de conferir altos títulos de IgG1 em camundongos, mas não foi o suficiente para reduzir a bacteremia e induzir proteção em camundongos desafiados com *S. pneumoniae*. **Conclusões.** Apesar da proteína ribossomal L31 recombinante ser imunogênica e gerar a produção de altos níveis de IgG1, não foi capaz de induzir a proteção. Sendo assim, a continuidade dos estudos será realizada em busca de novos antígenos protéicos, com a finalidade de avaliar sua imunogenicidade e capacidade protetora.

ABSTRACT

Introduction. The *Streptococcus pneumoniae*, known as pneumococcus, is an encapsulated gram-positive bacterium, possessing more than 90 known serotypes. Pneumococcus causes diseases such as pneumonia, meningitis, sepsis and acute otitis media. While there are vaccines available, all are based on polysaccharide antigens (conjugated or not), making them high cost and low coverage. **Objective.** This study aims to evaluate the immunogenic potential and protective capacity of ribosomal protein L31 recombinant in murine model, aimed at producing a vaccine based on the conserved protein antigens. **Methodology.** The choice of ribosomal protein L31, occurred from an *in silico* study conducted by the Department of Molecular Biology and Bioinformatics at FUNED. It, was made the prediction of possible protein antigens vaccine candidates based on the next features: the exposure on the cell surface, the conservation between the various serotypes and the possible virulence. Thus, the gene encoding ribosomal protein L31 was amplified from the genome of *S. pneumoniae*, cloned in expression vector pET-21a and confirmed by DNA sequencing. The protein expressed in *Escherichia coli* was purified by affinity chromatography and its immunogenicity was evaluated by Western blot using sera of patients with meningitis and rabbit serum immunized with the protein L31. Four distinct experiments were performed involving immunization of mice with ribosomal protein L31 recombinant, to evaluate: (1) the humoral response, comparing the pathway of administration; (2) humoral response comparing adjuvant; (3) cytokine production; and (4) bacteremia and survival after challenge with *S. pneumoniae*. **Results.** The gene was amplified and cloned successfully, confirmed by sequencing. Expression and purification of the protein L31 were performed with success, with a good yield after purification. The purified protein L31 proved to be immunogenic and was able to confer high titers of IgG1 in mice, but it was not enough to reduce bacteremia and induce protection in mice challenged with *S. pneumoniae*. **Conclusion.** Although the ribosomal protein L31 recombinant proved its immunoreactivity and induced high levels of IgG1, it was not able to induce protection. Thus, others studies will be conducted in search of new protein antigens, to evaluate the immunogenicity and protective capacity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O MICRORGANISMO: *Streptococcus pneumoniae*

O *Streptococcus pneumoniae*, mais conhecido como pneumococo, é uma bactéria gram-positiva e encapsulada. Apresenta morfologia de diplococos ou em cadeias curtas, que coloniza as mucosas do trato respiratório superior humano, podendo coexistir com a microbiota normal, sem causar qualquer sintoma (Velasco *et al.* 1995; Sociedade Brasileira de Imunizações, 2008).

O *S. pneumoniae* é transmitido por contato direto com secreções respiratórias, sendo considerado um microrganismo de importante causa de morbidade e mortalidade no mundo. O pneumococo causa doenças que atingem o trato respiratório e o cérebro, classificadas em: doenças pneumocócicas invasivas (pneumonia bacterêmica, meningite, sepse) e não invasivas, consideradas mais leves, mas de grande peso econômico e social que incluem sinusite, otite média aguda, conjuntivite e bronquite (Bridy-Pappas *et al.* 2005; Rudan *et al.* 2008; Zaidi *et al.* 2009; WHO(A), 2012; Portal da Saúde - Ministério da Saúde(A), 2012). Alguns grupos como os de crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos são mais susceptíveis à invasão do pneumococo (Centers for disease control and prevention, 2008).

Há mais de 90 sorotipos conhecidos de *S. pneumoniae*, e apenas alguns sorotipos tendem a estar associados a doença invasiva. Os sorogrupos mais comuns em todo o mundo são 6, 14, 19 e 23, mas alguns sorogrupos, como 1, 5 ou 8, contribuem muito para a doença pneumocócica invasiva em crianças nos países em desenvolvimento (Johnson *et al.* 2010; WHO(A), 2012). As cápsulas polissacarídicas, que consistem em cadeias de monossacarídeos que envolvem a bactéria, são o principal fator de virulência desse microrganismo. Essas cápsulas podem variar em composição e tamanho, sendo a base da diferenciação sorológica do *S. Pneumoniae* (Bentley *et al.* 2006; Hyams *et al.* 2010).

Como esquematizado na Figura 1, a superfície do pneumococo consiste de três estruturas distintas: membrana citoplasmática, parede celular e cápsula polissacarídica. Na membrana citoplasmática estão inseridas as moléculas de ácido lipoteicóico (antígeno F), contendo resíduos de fosfocolina (ChoP). A parede celular apresenta a inserção de moléculas de ácido teicóico (polissacarídeo C), ancorando diversas proteínas de superfície.

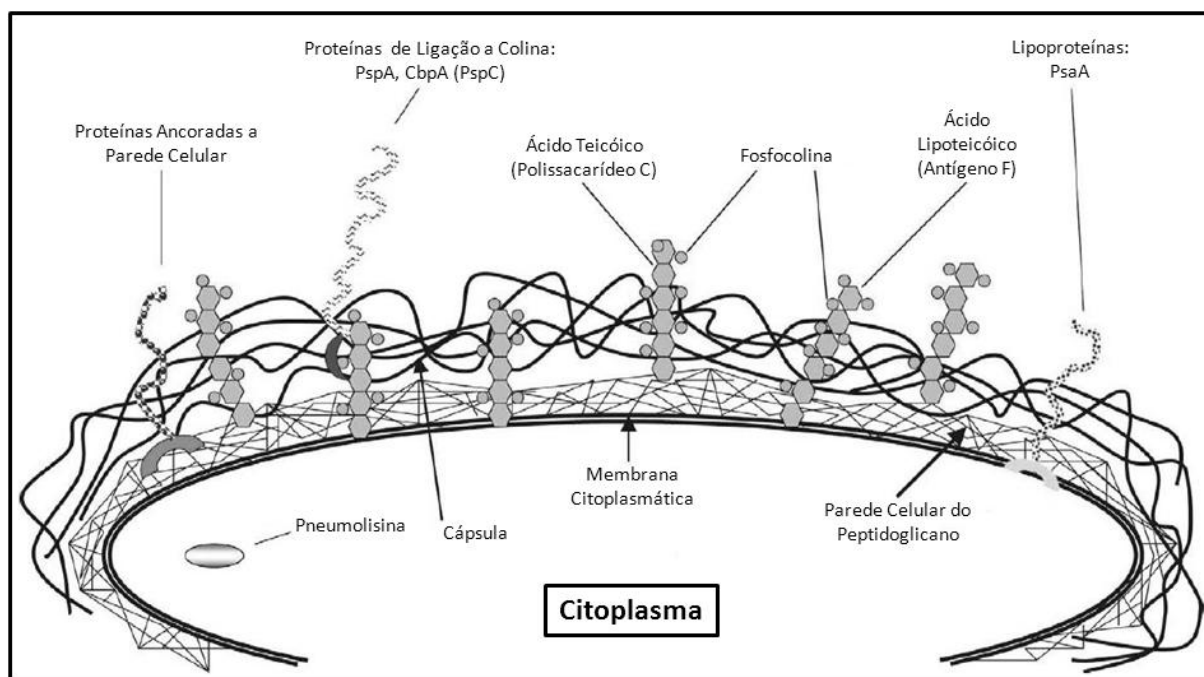


Figura 1. Esquema da estrutura do pneumococo.
 Fonte: Swiatlo & Ware, 2003 (modificado).

1.2 TRATAMENTO E PROFILAXIA

As doenças pneumocócicas são tratadas com β -lactâmicos (penicilina G, amoxicilina, cefalosporina), fluoroquinolonas respiratórias, macrolídeos e vancomicina, sendo a penicilina a droga de primeira escolha (Mandell *et al.* 2007). Entretanto, o tratamento vem se tornando mais difícil devido ao aumento do número de cepas resistentes aos antibióticos, um grave e crescente problema em todo o mundo por comprometer a eficácia terapêutica, o que aumenta a importância da prevenção da doença via vacinação (FIOCRUZ, 2012).

A vacinação é a forma mais eficiente de prevenir as doenças pneumocócicas em crianças. Também é responsável por diminuir a transmissão da bactéria entre a população de forma geral, diminuindo a ocorrência de doenças em todas as idades devido à proteção da população infantil (proteção indireta). Os idosos são os maiores beneficiados com a imunização indireta, que proporciona a redução do número de infecções e mortes ocasionadas pelos pneumococos nos maiores de 65 anos (FIOCRUZ, 2012).

Assim, é importante determinar os sorotipos locais e os padrões de resistência a antibióticos de isolados de *S. pneumoniae*, a partir de crianças com doença pneumocócica invasiva (DPI), a fim de proporcionar evidência e orientação para o uso de vacinas e antibióticos (Liu *et al.* 2013).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A incidência de doença pneumocócica invasiva em qualquer população é afetada pela localização geográfica, estação do ano, prevalência do sorotipo, idade e situação vacinal (Robinson *et al.* 2001). No Brasil, os dados obtidos com a investigação laboratorial de cepas invasivas de pneumococo no âmbito do projeto SIREVA (Vigilância Epidemiológica de *S. pneumoniae* na América Latina), sabe-se qual a prevalência dos sorotipos de pneumococos isolados de doenças invasivas em diferentes regiões geográficas. De acordo com os resultados apresentados por Brandileone (1999), os 15 sorotipos prevalentes em 1.069 crianças com menos de seis anos de idade, no período de 1993-1998, com doenças invasivas no Brasil foram os seguintes: 14(24,7%), 1(10,3%), 6B(10%), 18C(7,9%), 5(6,5%), 6A(5,4%), 23F(5,2%), 19F(4,5%), 9V(4,2%), 19A(3,2%), 3(2,3%), 4(1,6%), 10A(1,6%), 8(1,4%) e 7F (0,7%). Juntos, os outros sorotipos responderam por 10,5% dos casos.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 1,6 milhões de óbitos anuais estão relacionados com infecções pneumocócicas, o que inclui nesta estimativa as mortes de 700.000-1.000.000 de crianças menores de cinco anos (WHO(B), 2012). De acordo com estudos publicados no site da OMS, 156 milhões de novos casos de pneumonia ocorrem por ano em crianças com menos de cinco anos de idade, dos quais 9% necessitam de hospitalização. Nessa estimativa, o Brasil aparece na lista dos quinze países com maior taxa de novos casos anuais (Rudan *et al.* 2008).

A Organização Panamericana de Saúde, após análise dos dados epidemiológicos publicados entre 1990 e 2006 referente à América Latina e Caribe, constatou a ocorrência de 1.261.348 casos de otite média aguda, 268.432 casos de pneumonia, 3.918 casos de meningite e 1.229 casos de septicemia, resultando em mais de 18.000 óbitos anuais, tornando as doenças pneumocócicas um problema de saúde pública (Sabin Vaccine Institute, 2007). Um estudo realizado em 2010 mostra as principais causas de morte em crianças menores de cinco anos no mundo, apresentando um destaque para os casos de pneumonia (Fig.2).

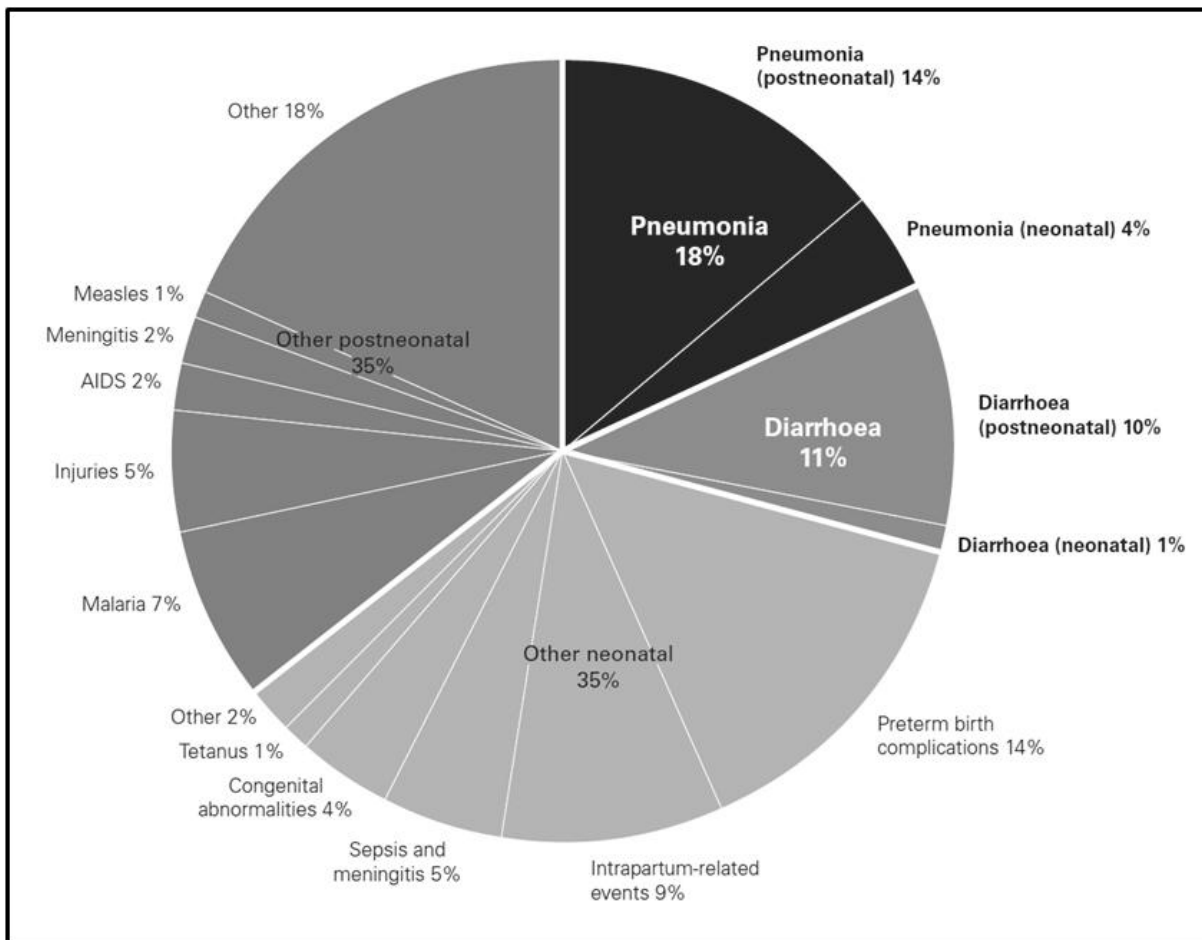


Figura 2. Distribuição global de mortes entre crianças menores de cinco anos.

Fonte: UNICEF, 2012.

Os estudos ressaltam que esses números são certamente subestimados devido à escassez de estudos epidemiológicos de qualidade que, na grande maioria, não incluem adultos e idosos, e também ao fato das doenças causadas pelo pneumococo não serem tratadas com a devida importância.

1.4 HISTÓRICO DAS VACINAS UTILIZADAS CONTRA *S. pneumoniae*

Na primeira década do século XX, iniciaram esforços para desenvolver uma vacina anti-pneumococo que levaram ao licenciamento da primeira vacina baseada nas propriedades antigênicas dos polissacarídeos da cápsula. No entanto, a introdução da penicilina e outros antibióticos destacaram a ação terapêutica em detrimento da profilaxia (Fedson & Musher, 2004).

O crescente aumento de resistência aos antibióticos voltou a chamar atenção para profilaxia e, na década de 80, foi licenciada uma nova vacina, composta de 23 antígenos

polissacarídicos, a Pneumovax (PPV-23). Esta vacina apesar de ter a vantagem de amplo espectro, possui uma desvantagem característica das vacinas polissacarídicas, a de estimular uma resposta T-independente, gerando uma imunidade de curta duração e sem indução de memória imunológica. Por isso, ela não é recomendada para crianças menores de dois anos, exatamente a faixa etária de maior risco de infecção, por não responder adequadamente aos antígenos T-independentes (Fedson & Musher, 2004; Kadioglu *et al.* 2008).

Diante das limitações da vacina polissacarídica PPV-23, surgiram as vacinas conjugadas que contêm sete, dez, ou treze sorotipos de pneumococos. Estas vacinas são licenciadas para crianças de até cinco anos de idade. Em 2000, Pneumovax foi substituída pela primeira vacina conjugada Prevnar 7 (PCV-7) contra o pneumococo, que inclui os polissacarídeos capsulares de sete sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F), conjugados individualmente a uma variante não tóxica da toxina diftérica (Black *et al.* 2000). Em 2009, Synflorix 10 (PCV-10) foi licenciada na Europa e está disponível em muitas partes do mundo para uso em crianças de 6 semanas a 2 anos. Além dos sorotipos da PCV-7, a vacina 10-valente inclui os sorotipos 1, 5 e 7F, que também garantem certa proteção contra as infecções não invasivas, principalmente a otite média aguda. O Ministério da Saúde, por meio do Programa Nacional de imunizações (PNI), incluiu em março de 2010 a vacina PCV-10 no calendário de vacinação infantil brasileiro (WHO(C), 2012; Portal da Saúde - Ministério da Saúde(A), 2012; Portal da Saúde - Ministério da Saúde(B), 2012). Foi aprovada em 2010 nos Estados Unidos a Prevnar (PCV-13), que inclui os sorotipos da PCV-10 mais os sorotipos 3, 6A e 19A. Ao contrário da vacina polissacarídica, as vacinas conjugadas são imunogênicas em crianças menores de dois anos de idade. A conjugação de polissacarídeos a proteínas carreadoras muda a natureza da resposta imune de T-independente para T-dependente, o que resulta em excelente resposta em lactentes e indução de memória imunológica (Eskola *et al.* 2004; WHO(C), 2012).

Além da baixa cobertura oferecida, diante dos mais de noventa sorotipos existentes, foi demonstrado que o uso da vacina conjugada induz uma redistribuição dos sorotipos, isto é, o aumento da colonização ou infecção com sorotipo até então pouco freqüente e não incluídos na vacina. A emergência de sorotipos menos comuns terá tendência a aumentar em freqüência nos próximos anos diminuindo a eficiência da vacina existente (Huang *et al.* 2005; Singleton *et al.* 2007). Outro problema é o alto custo dessas vacinas conjugadas, representando considerável dispêndio para o governo brasileiro que incorporou primeiramente a vacina conjugada PCV-7 e logo substituiu pela PCV-10 no Programa Nacional de Imunizações. Conseqüentemente, o desenvolvimento de uma vacina nacional e de menor custo, proporcionaria grande economia de recursos.

1.5 VACINAS BASEADAS EM ANTÍGENOS PROTÉICOS CONSERVADOS

As razões apresentadas acima apontam a necessidade de se desenvolver uma vacina baseada em antígenos conservados independente dos sorotipos e de baixo custo. Malley e colaboradores (2001) mostraram, em modelo animal, que a imunização com pneumococo sem cápsula, morto pelo calor, foi capaz de proteger contra o desafio com uma cepa encapsulada. Esse importante resultado redirecionou a pesquisa para desenvolver uma vacina que substituísse antígenos polissacarídicos por protéicos.

As proteínas de superfície são fortes candidatas à vacina, pois, como estão mais expostas, são mais facilmente apresentadas ao sistema imunológico. Ao longo dos anos, vários antígenos protéicos foram avaliados quanto à virulência e o seu potencial como vacina. Estudos mostraram que algumas dessas proteínas demonstraram eficácia como imunógenos em modelos animais. Wu e colaboradores (1997) avaliaram o potencial da proteína PspA, e constataram que a imunização intranasal em camundongos foi capaz de proteger contra o desafio com *S. pneumoniae* em modelo de sepse e pneumonia. Os estudos com a proteína PspA avançaram, e ela mostrou-se segura e altamente imunogênica na fase I de testes clínicos em humanos (Briles *et al.* 2000; Nabors *et al.* 2000). Várias outras proteínas apresentaram-se como bons imunógenos e com capacidade de induzir proteção, - pelo menos parcial - em modelo animal, tais como PspC, SrtA, PiaA, PiuA, PsaA e ClpP (Talkington *et al.* 1996; Balachandran *et al.* 2002; Jomaa *et al.* 2006; Cao *et al.* 2008; Gianfaldoni *et al.* 2009). Portanto, as proteínas pneumocócicas de superfície vêm se destacando como promissoras candidatas a vacinas. Em contraste aos antígenos polissacarídeos, essas proteínas são conservadas a todos os sorotipos de *S. pneumoniae*, e atualmente, as mais atraentes são a PspA e a PspC, devido ao seu potencial em estimular a produção de anticorpos opsonizantes (Kadioglu *et al.* 2008; Frolet *et al.* 2010).

Os estudos citados acima direcionam as pesquisas para a busca de uma vacina protéica baseada não apenas em uma proteína, e sim, em uma combinação das mesmas, tendo em vista que os estudos dessas proteínas individualmente mostraram uma proteção parcial. Um estudo em modelo animal de pneumonia, avaliou três proteínas (PspA, PsaA e Pneumolisina), individualmente e aos pares, revelando que a combinação entre PspA e pneumolisina, apresentaram uma melhor proteção (Briles *et al.* 2003). Estas duas proteínas, também em combinação, já tinham mostrado um potencial de proteção em modelo de sepse (Ogunniyi *et al.* 2000). Cada vez mais antígenos protéicos vêm sendo utilizados em combinação. Como exemplo, Ogunniyi e colaboradores (Ogunniyi *et al.* 2007) avaliaram as proteínas pneumolisina, PspA, PspC, PhtB e PhtE individualmente e em combinações de até três proteínas em modelo de sepse, mostrando que o grupo de camundongos que apresentou maior sobrevivência após o desafio, foi o que recebeu combinação de pneumolisina,

PspA e PspC. Por fim, os dados de estudos com animais sugerem que, antígenos protéicos podem ser menos potentes do que os polissacarídeos capsulares quando utilizados individualmente, mas são sinérgicos em combinação, indicando que uma vacina à base de proteínas pode exigir vários antígenos combinados para ser eficaz (Cao *et al.* 2007; Moffitt & Malley, 2011).

1.6 A BIOINFORMÁTICA NA BUSCA DE ANTÍGENOS PROTÉICOS

A era genômica possibilitou novas abordagens na busca de antígenos protéicos candidatos a vacina. O acesso aos genomas completos de microorganismos, associado ao desenvolvimento de poderosos *softwares* que permitem a identificação de fases de leitura aberta (ORFs), a determinação da localização celular, da virulência e imunogenicidade das proteínas codificadas abriram grandes perspectivas na área da vacinologia, permitindo a identificação de dezenas de potenciais antígenos simultaneamente.

Um critério importante para uma proteína ser considerada um antígeno é a sua localização celular. De fato, proteínas restritas ao citoplasma não são consideradas bons imunógenos, ao contrário das proteínas secretadas ou associadas à superfície celular, estando mais acessíveis ao reconhecimento por anticorpos. Em 2001, um primeiro trabalho baseado na investigação computacional de uma cepa de *S. pneumoniae* do tipo 4 conseguiu identificar 130 ORFs com características de proteínas de superfície. Destes, 108 ORFs foram clonadas, expressas e analisadas como candidatas a vacina. Algumas mostraram proteção razoável em camundongos num modelo letal de septicemia, fornecendo a prova que o conceito de predição *in silico* é uma ferramenta válida para pesquisa na área de vacina (Wizemann *et al.* 2001). Viratoyim e colaboradores (2008), utilizando uma combinação de programas computacionais preditivos da localização celular, foram capazes de identificar 114 prováveis proteínas secretadas e 63 prováveis proteínas de membrana de *Leptospira interrogans*, que poderão ser investigadas como novos alvos para tratamento ou desenvolvimento de vacina.

Outro critério é o papel das proteínas na patogenicidade do microorganismo estudado. Até o momento, as várias proteínas de superfície do *S. pneumoniae* que foram descritas como imunógenos estão associadas à adesão e colonização das mucosas ou penetração e invasão de tecido do hospedeiro (Adamou *et al.* 2001; Dave *et al.* 2004; Hirst *et al.* 2008). Recentemente, Garg & Gupta (2008) desenvolveram um programa capaz de prever com 80% de certeza se uma determinada proteína está envolvida em mecanismos de virulência. Além disso, vários outros programas foram desenvolvidos para identificar, dentro de uma seqüência protéica, epitopos capazes de se ligar nas moléculas do Complexo de Histocompatibilidade (MHC) ou nas imunoglobulinas dos linfócitos B, dando assim um

indicativo da imunogenicidade destas proteínas (Manzalawy *et al.* 2008; Feldhahn *et al.* 2008).

Tendo em vista que vários genomas de *S. pneumoniae* estão disponíveis e que as ferramentas de bioinformática estão cada vez mais robustas, foi realizado um estudo anterior pelo Serviço de Biologia Molecular e Bioinformática da FUNED, onde foi feita uma triagem de todos os genomas de *S. pneumoniae* disponíveis, cruzando as informações de vários tipos de programas computacionais, para identificar possíveis antígenos protéicos conservados entre os vários sorotipos (Carvalho *et al.* 2010).

De um modo geral, a ferramenta mais utilizada para determinar a localização celular de uma proteína é o algoritmo pSORT (Protein Subcellular Localization Prediction) (Nakai and Horton, 1999). O programa classifica uma proteína como possivelmente “secretada”, “membrana plasmática”, “citoplasmática” ou “desconhecida”, baseado principalmente na busca do peptídeo sinal presente na extremidade N-terminal de uma proteína de superfície. As categorias “citoplasmática” e “desconhecida” são então frequentemente descartadas para busca de novos antígenos. No entanto, tem sido descrito recentemente, proteínas sem peptídeo sinal presentes na superfície de vários microorganismos (Chhatwal, 2002). E um novo algoritmo, o Secretome P (Bendtsen *et al.* 2004), foi desenvolvido no intuito de identificar essas proteínas. Consequentemente, no trabalho desenvolvido na Funed, duas estratégias, resumidas no esquema abaixo, foram utilizadas:

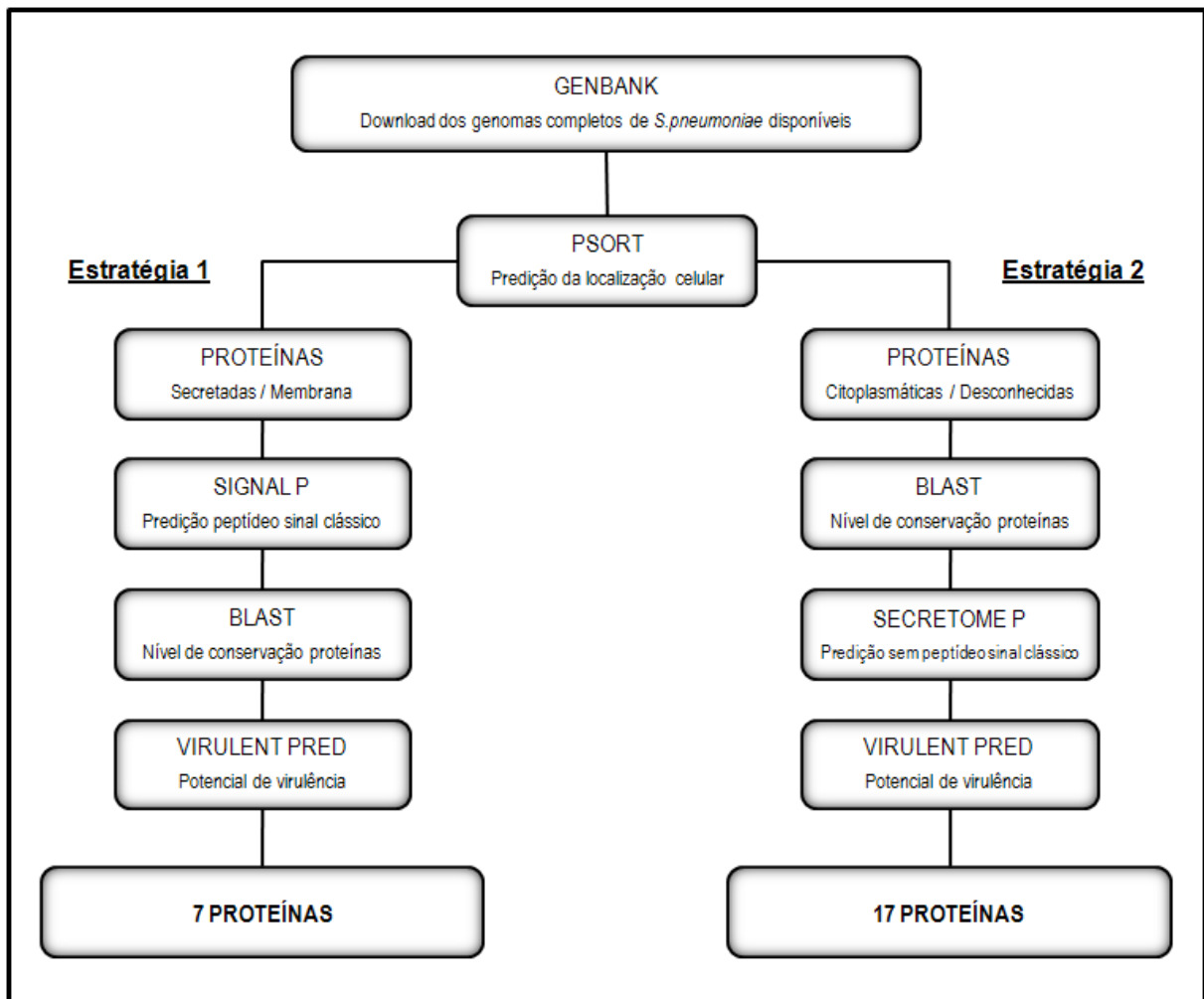


Figura 3. Esquema das duas estratégias de bioinformática.

Resumidamente, os genomas de *S.pneumoniae* disponíveis no GenBank foram submetidos ao programa pSORT. Na primeira estratégia, como candidatos foram selecionadas proteínas de membrana celular e membrana citoplasmática. O software SignalP foi utilizado para prever a presença de um peptídeo sinal nas proteínas selecionadas. Essas seqüências foram alinhadas entre si com o programa BLASTp para obter o nível de conservação entre elas. As proteínas com o nível de conservação de 100% foram utilizadas como entrada para o software VirulentPred para prever o potencial de virulência das mesmas. Como resultado final, 7 proteínas com peptídeo sinal clássico foram apontadas como sendo de superfície e possivelmente virulentas, sendo assim escolhidas como candidatos a uma vacina.

Na segunda estratégia, como candidatos foram selecionadas proteínas citoplasmáticas e proteínas desconhecidas. Essas seqüências foram alinhadas entre si com o programa BLASTp, sendo selecionadas as proteínas com o nível de conservação entre 98 e 100%. Em seguida, o software SecretomeP foi utilizado para prever as proteínas

secretadas de forma não clássica, ou seja, que não possuem um peptídeo sinal. Dando continuidade, as proteínas preditas pelo SecretomeP, foram usadas como entrada para o software VirulentPred para prever o potencial de virulência dessas proteínas. Como resultado final, 17 proteínas foram apontadas e escolhidas como candidatas a uma vacina.

No presente trabalho cinco antígenos protéicos selecionados pelas ferramentas de bioinformática, na segunda estratégia, foram clonados e testados quanto à expressão e purificação. Diante desses testes apenas a proteína ribossomal L31 apresentou um bom rendimento. Então, com o foco nessa proteína, o trabalho se propôs em avaliar a imunogenicidade e a capacidade protetora da mesma visando o desenvolvimento de uma vacina.

Considerando o interesse da FUNED, sua capacidade instalada para produção, e a necessidade de melhorar e ampliar a produção de vacinas no país, a proposta deste trabalho é de grande relevância, e poderia trazer duas vantagens em relação à vacina conjugada atualmente disponível. Primeiro, uma vacina baseada em antígenos protéicos conservados permitiria uma ampla cobertura independentemente dos sorotipos de *S. pneumoniae* circulantes no país. E, segundo, uma vacina de tecnologia nacional apresentaria um menor custo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial imunogênico e a capacidade protetora da proteína ribossomal L31 recombinante em modelo murino de infecção com *S. pneumoniae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obtenção do gene da proteína ribossomal L31 pela técnica de PCR, a partir do DNA genômico de *S. pneumoniae*;

Clonagem do gene da proteína ribossomal L31 no plasmídeo pET-21a e expressão em *E. coli* da linhagem BL21(DE3);

Purificação da proteína ribossomal L31 recombinante por meio da cromatografia de afinidade;

Avaliação da resposta humoral e celular dos camundongos imunizados com a proteína ribossomal L31 recombinante;

Determinação da bacteremia e sobrevida dos camundongos imunizados com a proteína ribossomal L31 recombinante e desafiados com *S. pneumoniae*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *Streptococcus pneumoniae*

O DNA genômico do sorotipo 14 de *S. pneumoniae* foi fornecido pelo Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas da Diretoria do Instituto Octávio Magalhães (FUNED). Um isolado clínico de *S. pneumoniae* foi cultivado em meio complexo de Ágar Sangue. Após a semeadura, as placas foram incubadas a temperatura de 35°C, na presença de 5 a 10% de CO₂ entre 24 e 38 horas. O DNA genômico foi extraído utilizando um kit comercial (*Bacteria Genomicprep Mini Spin Kit, GE Healthcare*) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante e, logo em seguida, armazenado a -20°C.

3.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31

A sequência do gene que codifica a proteína ribossomal L31 de *S. pneumoniae* foi obtida através do banco de dados disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

A amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) do fragmento de DNA de 243pb contendo a sequência codificadora do gene L31 foi realizada a partir do DNA genômico de *S. pneumoniae* sorotipo 14. Para isto, dois iniciadores foram desenhados contendo um sítio artificial de restrição (*Nde I* e *Xho I*) em cada extremidade (Tabela 1).

Para um volume final de 25µL por reação foi utilizado, 0,25µL ou 1u de Taq polymerase (Fermentas), 2,5µL de tampão 10 X (Fermentas), 0,5µL do mix de dNTPs 10mM (Fermentas), 2µL de MgCl₂ 25mM (Fermentas), 2µL de cada iniciador na concentração de 5pMoles/µL, 5µL (180ng) de DNA molde e 10,75µL de H₂O nuclease free. As condições utilizadas na amplificação foram: primeira desnaturação a 94°C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos; anelamento dos iniciadores a 55°C por 30 segundos; extensão a 72°C durante 45 segundos; e extensão final por 7 minutos a 72°C.

A amplificação do gene foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%. A partir do produto da amplificação foi feita a purificação do DNA por meio do Kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE) de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza do DNA purificado foram então estimadas através da leitura em espectrofotômetro a 260nm.

Tabela 1: Iniciadores utilizados na amplificação do gene L31

INICIADORES	SEQUÊNCIA
Senso: sítio de restrição <i>Nde I</i> (sublinhado)	5' ACAG <u>CATATG</u> AAAAAAGATATCCATCC 3'
Anti Senso: sítio de restrição <i>Xho I</i> (sublinhado)	5' TTCG <u>CTCGAG</u> TTTGAGACCGTATTTTTTGT 3'

3.3 CLONAGEM DO GENE L31 NO SISTEMA pET-21a

O plasmídeo pET-21a (Novagen) possui 5443pb, e como principais características apresenta: gene que confere resistência à ampicilina; um promotor forte, o T7 promoter de bacteriófago; uma cauda com 6 histidinas, que facilita tanto a purificação da proteína quanto o seu reconhecimento por Western Blot; e a presença do operador lac com seu sistema de indução por β -D-isopropil-tiogalactopiranosídeo (IPTG) . Além disso, sua região de clonagem possui sítios para várias enzimas de restrição, inclusive *Nde I* e *Xho I*, que foram selecionadas para digestão do plasmídeo e do gene (Fig.4).

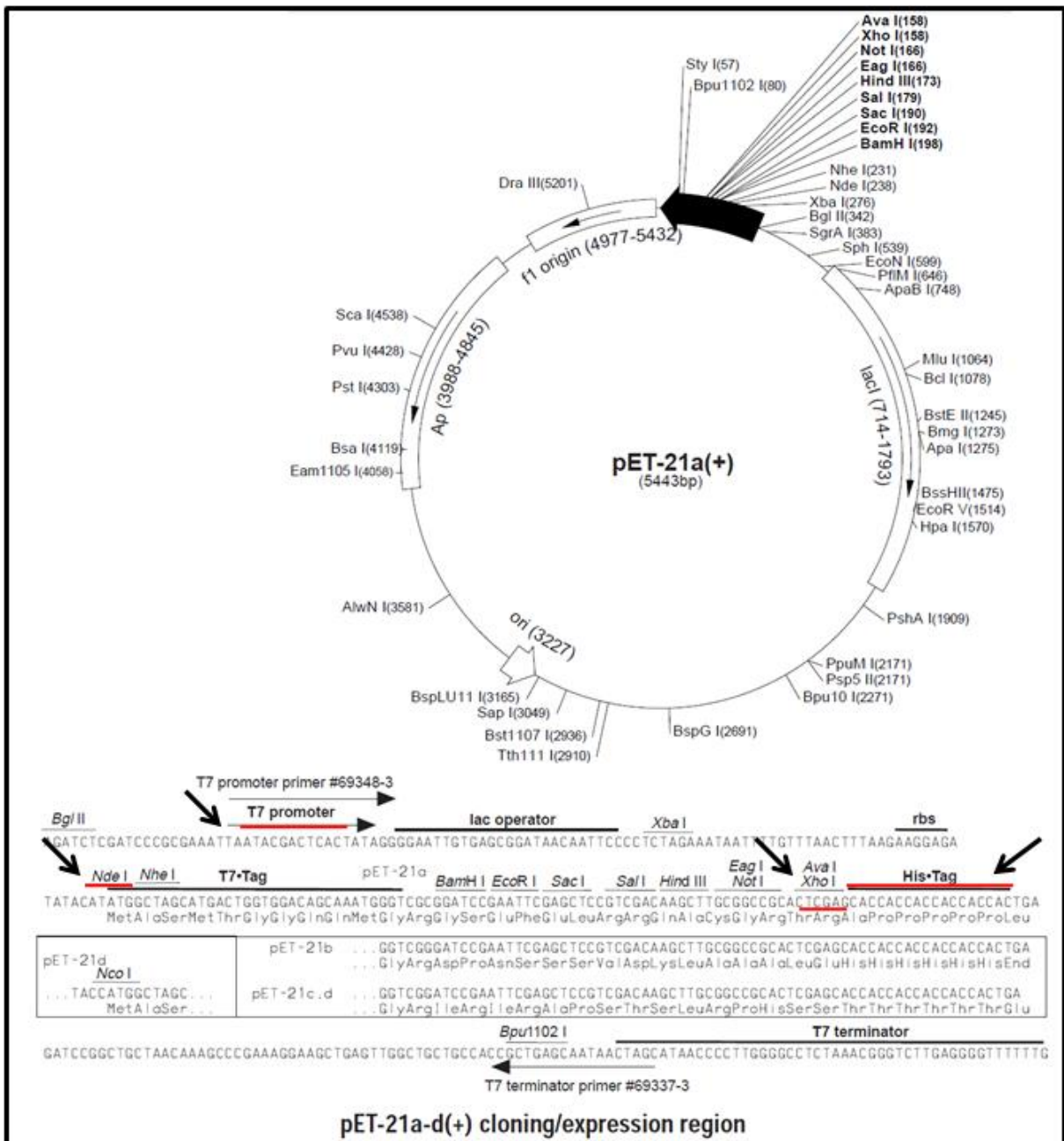


Figura 4. Mapa e sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pET-21a. As setas indicam o promotor T7, a cauda de histidina e os sítios de restrição para as enzimas *Nde I* e *Xho I*.

Fonte: Novagen, 1998.

3.3.1 Digestão enzimática e purificação do gene L31 e do plasmídeo pET-21a

Tanto para o gene L31 quanto para o plasmídeo pET-21a foram feitas duas reações de digestão enzimáticas. Na primeira digestão foi utilizada a enzima *Nde I* (Fermentas). Em seguida a qualidade da digestão foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% e os produtos da digestão foram precipitados utilizando glicogênio. Depois foi realizada a

segunda digestão com a enzima *Xho I* (Fermentas) e uma nova precipitação por glicogênio. As condições das digestões enzimáticas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Condições para digestão enzimática

REAGENTES	QUANTIDADES
Gene / Plasmídeo	25μL (2μg) / 12μL (2μg)
Enzimas Nde I / Xho I	1μL (10u)
Tampões 10X O e R	3μL
H ₂ O nuclease free	q.s.p 30μL

Para realização da precipitação com glicogênio, para cada 30μL do produto foram adicionados 2μL de acetato de amônia 7,5M, 2μL de glicogênio 20mg/mL e 30μL de etanol absoluto gelado. Os tubos contendo a amostra foram homogeneizados com pipeta e incubados em gelo por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13000rpm a 4°C por 15 minutos, e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. Acrescentou-se 200μL de etanol 70% gelado e as amostras foram centrifugadas a 13000rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e o precipitado incubado a 37°C por 30 minutos para evaporação completa do etanol.

3.3.2 Desfosforilação do plasmídeo pET-21a

Após a realização das duas digestões e purificação dos produtos, o plasmídeo pET-21a foi desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP, *Shrimp Alkaline Phosphatase*) da Fermentas para evitar sua auto-ligação. A reação foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3.3 Reação de ligação do plasmídeo pET-21a ao gene L31

A reação de ligação entre o plasmídeo e o gene foi feita na proporção aproximada de 1:10, sendo utilizado 150ng do vetor para 70ng do gene. A proporção (Plasmídeo / Gene) foi calculada a partir da fórmula abaixo.

$$X \text{ (ng gene)} = Y \text{ (pb gene)} \times Z \text{ (ng vetor)} / \text{Tamanho do vetor (pb)} \quad \Longrightarrow \quad 1:1$$

A reação foi realizada de acordo com recomendações do fabricante (T4 DNA Ligase, Promega).

3.3.4 Preparo de células competentes de *Escherichia coli* da linhagem NM522

Uma pré-cultura foi preparada contendo 10µL de *E. coli* da linhagem NM522 em 5mL de meio de cultura LB Broth (Lennox, BioAmerica), e incubada a 37°C por 16 horas sob agitação. Uma alíquota de 200µL dessa pré-cultura foi inoculada em 40mL de meio LB, incubada com agitação a 37°C por aproximadamente 2 horas, até atingir uma densidade óptica a 600nm (DO₆₀₀) entre 0,4 e 0,7. O meio de cultura contendo as bactérias foi centrifugado a 3000rpm por 10 minutos a 4°C. Logo depois o sobrenadante foi descartado, o precipitado ressuspendido em 20mL de CaCl₂ (50mM) gelado e incubado por 20 minutos em banho de gelo. A suspensão foi centrifugada como descrito anteriormente e ressuspendida em 2mL de CaCl₂ (50mM) gelado. As bactérias competentes foram mantidas em banho de gelo por 1 hora até serem utilizadas na transformação.

3.3.5 Transformação de *E. coli* NM522 competente com plasmídeo pET21-a/L31

A transformação bacteriana foi realizada com a adição de 5µL do produto de ligação - plasmídeo pET-21a/L31 - em 100µL de células competentes e mantida em banho de gelo por 30 minutos. O microtubo contendo as células competentes e o produto da ligação, foi colocado em banho maria a 42°C por 90 segundos e logo após em banho de gelo por 2 minutos. Depois foi acrescentado 500µL de meio LB e incubado com agitação a 37°C por 1 hora. Em seguida 200µL da transformação foi semeada em placa de Petri contendo meio LB ágar (Lennox, BioAmerica) e ampicilina 100µg/mL. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 16 horas. Foram feitos um controle negativo contendo somente células competentes sem adição de DNA e um controle positivo adicionando 100ng do plasmídeo pET-21a íntegro.

3.3.6 PCR de colônias para seleção dos clones positivos

Algumas colônias foram selecionadas aleatoriamente e submetidas a PCR para confirmação da incorporação do gene L31 ao plasmídeo pET-21a. Para a realização da PCR, uma pequena porção de cada colônia foi obtida com uma ponteira de 100µL. Essas bactérias foram rompidas para liberação do DNA plasmidiano utilizando um tampão de lise bacteriana (20mM Tris-HCl pH 8,0, 2mM EDTA, 1% de Triton X-100), aquecidas por 5 minutos entre 80°C e 90°C em banho de óleo. Logo em seguida foram centrifugadas por 5 minutos a 6000rpm. A reação e as condições para realização da PCR foram as mesmas descritas anteriormente, porém como DNA molde foi utilizado 5µL do sobrenadante da lise bacteriana. A PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%.

3.3.7 Reação de sequenciamento

Os clones positivos confirmados pela PCR de colônias foram inoculados em 10mL de meio LB contendo ampicilina 100µg/mL e mantidos a 37°C sob agitação por 16 horas . Alíquotas de 500µL - contendo glicerol na concentração final de 20% - foram armazenadas a -80°C. Com o restante dessas culturas contendo os clones positivos, foram feitas as extrações de DNA plasmidial utilizando o Kit (AxyPrep Plasmid Miniprep Kit, Axigen). Em seguida foi feito um sequenciamento automático baseado no método didesoxi, utilizando uma marcação fluorescente para cada ddNTP. A reação de sequenciamento foi feita 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 do plasmídeo pET-21a (Tabela 3).

Tabela 3: Iniciadores utilizados na reação de sequenciamento

INICIADORES	SEQUÊNCIA
Senso: T7 Promoter	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
Anti Senso: T7 Terminator	5' TATGCTAGTTATTGCTCAG 3'

3.3.8 Transformação do plasmídeo pET-21a/L31 em *E. coli* da linhagem BL21(DE3)

O plasmídeo pET-21a/L31 selecionado foi transformado em células BL21(DE3), uma linhagem adaptada para expressão. Esta linhagem possui um sistema de controle da expressão por meio da indução com IPTG. As células competentes, a transformação e a PCR de colônias, foram realizadas como descrito anteriormente.

3.4 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31 RECOMBINANTE EM BL21(DE3)

Após a transformação do plasmídeo pET-21a/L31 em *E. coli* (linhagem BL21), foram escolhidos aleatoriamente algumas colônias sendo submetidas a PCR para confirmação da presença do mesmo. Confirmada a presença, um clone foi submetido a testes de expressão.

A partir desse clone foi feito uma pré-cultura em 5mL de meio LB contendo ampicilina 100µg/mL, a 37°C por 16 horas sob agitação. Seiscentos microlitros dessa pré-cultura foi inoculados em 20mL de meio LB contendo ampicilina 100µg/mL, e incubada a 37°C por aproximadamente duas horas sob agitação, até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,4 e 0,7.

A expressão da proteína ribossomal L31 recombinante se deu através do sistema de indução por IPTG, como mostrado na Figura 5. Após atingir a DO desejada, uma amostra de 1mL (T_0) foi retirada da cultura e incubada novamente, e ao restante foi adicionado o indutor IPTG na concentração de 1mM. Em intervalos de uma em uma hora foram retiradas alíquotas de 1mL correspondendo aos tempos T_1 , T_2 , T_3 e T_4 que foram centrifugadas a 6000rpm por 5 minutos. Essas alíquotas foram ressuspensas em 100 μ L de tampão de amostra 2X com redução (Tris-HCl 2,5mM pH 6,8; glicerol 5%; Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,5%; β -mercaptoetanol 10%; azul de bromofenol 0,2%) e analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) corado com Azul de Coomassie para avaliação da expressão.

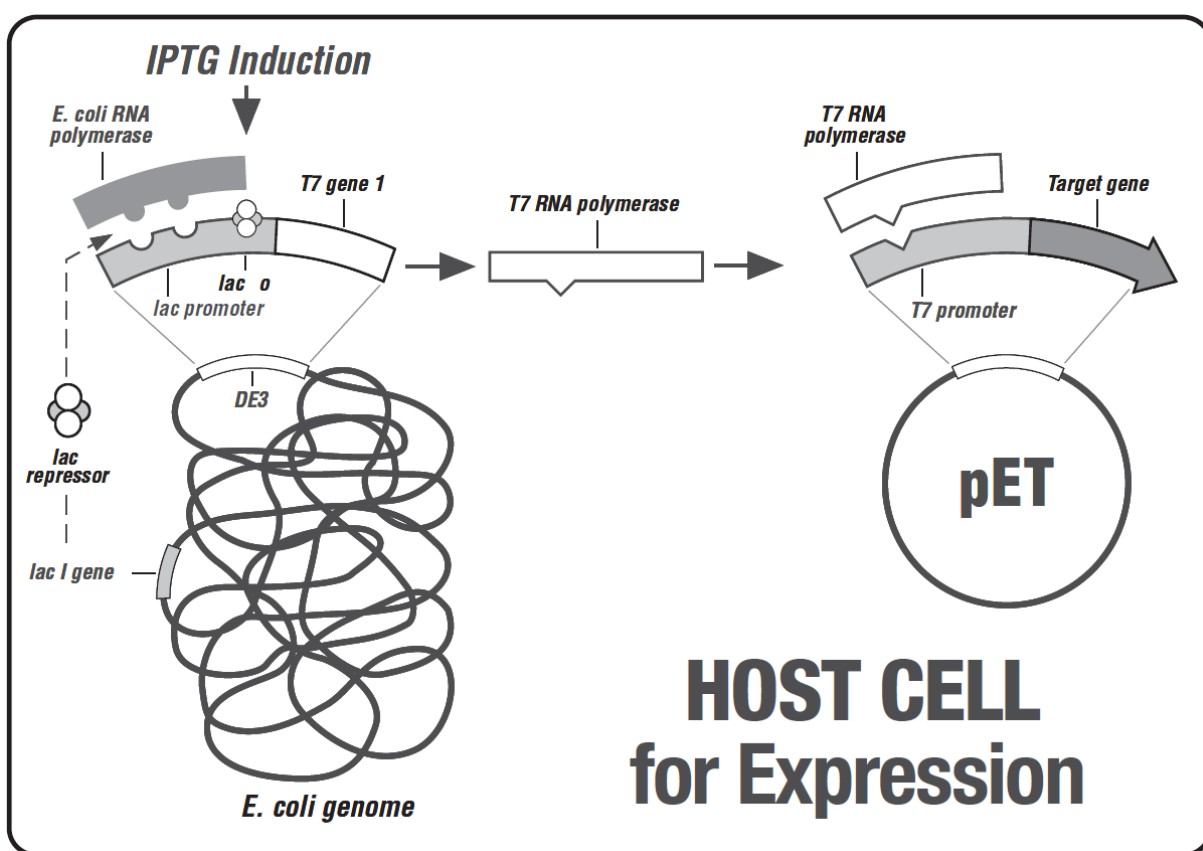


Figura 5. Esquema do sistema de indução de expressão em BL21 com plasmídeo pET.

Fonte: Novagen, 2003.

3.4.1 Determinação da solubilidade da proteína ribossomal L31 recombinante

Após a indução por IPTG as células foram coletadas por centrifugação a 3000rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado armazenado à -20°C por 30 minutos. Logo após o precipitado foi deixado a temperatura ambiente por 10 minutos para ruptura das células. Essas células foram ressuspensas em tampão de lise (Tris-HCl 50mM pH 8,0; EDTA

2mM), sonicadas 3 vezes por 30 segundos e centrifugadas a 12000rpm a 4°C por 15 minutos para separação das proteínas solúveis, presentes no sobrenadante, e as insolúveis presentes no precipitado. A determinação da solubilidade foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) corado com Azul de Coomassie.

3.4.2 Solubilização da proteína ribossomal L31 recombinante com Uréia

Quatro tubos contendo o precipitado de proteínas coletado na etapa anterior (corpos de inclusão) em igual quantidade foram submetidos a testes de solubilização com uréia. Cada tubo foi ressuscitado na proporção 1:10 (tampão:precipitado) em tampão uréia (Uréia; Tris-HCl 400mM pH 8,0; EDTA 2mM pH 8,0; NaCl 100mM) nas concentrações de 2, 3, 4 e 5M respectivamente, ficando em repouso a temperatura ambiente por 30 minutos. Logo após o período de repouso, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos à 14000rpm e o sobrenadante (proteínas solubilizadas) e o precipitado (proteínas insolúveis) analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) corado com Azul de Coomassie.

3.5 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31 RECOMBINANTE

A proteína ribossomal L31 recombinante obtida foi purificada por meio da cromatografia líquida de afinidade, no aparelho ACTA Purifier (GE). A coluna utilizada foi a His Trap™ FF crude 1mL, e, como ligante foi utilizado sulfato de níquel (0,1M), que forma um complexo com a cauda de histidina. Para ser aplicada na coluna, o sobrenadante contendo as proteínas solubilizadas foi centrifugado a 14000rpm por 10 minutos e diluído na proporção de 1:1 em tampão start (Na_2HPO_4 1,39g/L; KH_2PO_4 1,41g/L; NaCl 1M; Imidazol 10mM).

A coluna foi lavada com 10mL de água destilada e equilibrada com 10mL de tampão start. Para cada corrida, 10mL do sobrenadante foram aplicados na coluna. Por meio de um gradiente decrescente de tampão start contendo uréia, a coluna foi lavada até que a concentração de uréia chegasse a zero. A amostra foi eluída com gradiente crescente de imidazol (Na_2HPO_4 1,39g/L; KH_2PO_4 1,41g/L; NaCl 1M; Imidazol 500mM) que compete com a cauda de histidina pelo sulfato de níquel.

Ao final de cada corrida, os tubos contendo a proteína purificada foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) corado com nitrato de prata. A dosagem foi estimada pela leitura a 280nm em espectrofotômetro.

3.5.1 Western blot para confirmação da presença da cauda de histidina e da imunogenicidade da proteína recombinante L31

Amostras da proteína recombinante L31 purificada foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE). Após a corrida as mesmas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose a uma tensão de 110V, corrente de 400mA, potência de 50W durante uma hora, utilizando o tampão de transferência (Tris-HCl pH 8,3 25mM; Glicina 192mM; Metanol 20%).

Concluída a transferência, a membrana de nitrocelulose foi lavada com solução PBST (PBS 0,1M pH 7,4; Tween 20 0,05%), colocada em solução de bloqueio (leite em pó desnatado 1% em PBST), e incubada a temperatura ambiente por uma hora sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada e incubada a temperatura ambiente por uma hora sob agitação com a solução de anticorpo específica para cada análise (Anti-His - GE 1:5.000; Soro de paciente com diagnóstico de meningite 1:100; Soro hiperimune de coelho imunizado com proteína recombinante L31 1:10000). Depois de incubada com os soros específicos, a membrana foi lavada e incubada com conjugado Proteína A-peroxidase diluído 1:5000 a temperatura ambiente por uma hora sob agitação. A mesma foi novamente lavada, e incubada com substrato (Tris-HCl 0,05M pH 8,0; Diaminobenzidine - DAB 0,5mg/mL; H₂O₂ 30%) por até quinze minutos sob ausência de luz. A reação foi interrompida com água destilada.

3.6 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FUNED e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG.

Foram realizados quatro experimentos distintos, como descrito no Quadro 1. A linhagem de camundongos utilizada foi a *Swiss webster*, com peso entre 18 e 23 gramas, imunizados 3 vezes com a proteína ribossomal L31 recombinante com intervalos de 15 dias entre as imunizações. Os adjuvantes utilizados foram Freund completo e incompleto e uma formulação desenvolvida pela Diretoria Industrial e Diretoria de Pesquisa da FUNED denominada Microemulsão (Miristato de isopropila; Polissorbato 80; Propilenoglicol) na proporção de 1:1.

Em paralelo ao experimento com camundongos, uma coelha da raça Nova Zelândia foi imunizada com 250µg da proteína L31 recombinante, com intervalos de quinze dias e um total de três imunizações. Ao final o soro obtido foi armazenado a -20°C para realização do Western Blot e para experimentos futuros.

Quadro 1: Experimentos de imunização com a proteína ribossomal L31 recombinante

EXPERIMENTOS	GRUPOS	NÚMERO DE ANIMAIS POR GRUPO	QUANTIDADE PROTEÍNA APLICADA POR IMUNIZAÇÃO EM CADA ANIMAL	VIA ADMISTRAÇÃO	ADJUVANTE	OBJETIVO
1	Controle	5	PBS	Intraperitoneal	Freund completo na 1º imunização e incompleto nas demais	Avaliar resposta humoral comparando as vias de administração
	Subcutânea		1º - 30µg 2º - 30µg 3º - 30µg	Subcutânea		
	Intraperitoneal		Intraperitoneal			
2	Controle	5	PBS	Subcutânea	Freund completo e incompleto	Avaliar a resposta humoral comparando os adjuvantes
	Freund		1º - 30µg 2º - 15µg 3º - 15µg		Microemulsão	
	Microemulsão					
3	Controle	10	PBS	Subcutânea	Freund completo e incompleto	Extração das células do baço para avaliação da produção de citocinas
	Freund		1º - 30µg 2º - 15µg 3º - 15µg			
4	Controle	10	PBS	Subcutânea	Freund completo e incompleto	Desafio com <i>S. pneumoniae</i> sorotipo 4
	Freund		1º - 30µg 2º - 15µg 3º - 15µg		Microemulsão	
	Microemulsão					

3.6.1 Avaliação da resposta humoral dos camundongos

Para cada experimento mostrado no Quadro 1, cerca de 150 a 300µL de sangue de cada camundongo foi coletado por via caudal, antes do início da imunização, quinze dias após a primeira e a segunda imunização e sete dias após a terceira imunização. O soro foi separado do plasma por centrifugação e armazenado a -20°C. Os níveis de anticorpos foram avaliados pela técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) como descrito abaixo.

Placas de 96 poços (NUNC) foram sensibilizadas com 2,5µg/mL da proteína recombinante L31 em tampão de sensibilização carbonato pH=9,6 (Na₂CO₃ 1,59g; NaHCO₃ 2,93g; H₂O q.s.p 1000mL), a 4°C por 16 horas. Cada placa foi lavada duas vezes com solução de lavagem (NaCl 9,0g; Tween20 500µL; H₂O q.s.p 1000mL) e bloqueada com leite em pó 1%, a 37°C por uma hora. Em seguida as placas foram lavadas duas vezes e incubadas com diluições seriadas do soro dos camundongos em tampão de incubação (Tween20 1mL; PBS 1M pH=7,0 100mL; H₂O q.s.p 1000mL), a 37°C por uma hora a partir da diluição 1:25. Após a incubação com o soro, essas placas foram lavadas quatro vezes. Para 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 1:5000 - Sigma / IgG1-peroxidase 1:4000 - Southern Biotech / IgG2a-peroxidase 1:2000 - Invitrogen), a 37°C por uma hora. Logo após as placas foram lavadas quatro vezes e incubadas com solução de revelação (o-phenylenediamine dihydrochloride -OPD 5mg; H₂O₂ 4 µL; Tampão Citrato (Na₂HPO₄ 7,19g; Ácido cítrico 5,19g; H₂O q.s.p 1000mL) 10mL) a temperatura ambiente, sob ausência de luz, por 10 a 15 minutos. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 5%, e a leitura da absorbância feita no leitor de ELISA ao comprimento de onda de 492nm.

Os gráficos comparando os níveis e títulos de anticorpos foram feitos utilizando o programa *GraphPad Prism 4*, e as análises estatísticas foram feitas pelo teste de *Mann-whitney* (P<0,05) no mesmo programa.

3.6.2 Avaliação da resposta celular dos camundongos

Os camundongos do experimento três (Quadro 1) foram eutanasiados em câmara de CO₂. Foi realizada a retirada dos baços dos camundongos em ambiente estéril. Para a extração das células, os baços (dois a dois) foram macerados (Cell Dissociation Sieve Tissue Grinder Kit - Sigma) até a obtenção de suspensões homogêneas de células. As células mononucleares foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade

utilizando Ficoll e lavadas duas vezes com PBS 0,1M estéril. Após a lavagem foi feita a contagem das células em câmara de Neubauer e o cultivo em placa de 96 poços fundo em U, totalizando 10^6 células por poço. Essas células foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino) e 1% de antibióticos (Antibiotic Antimycotic Solution 100x - Sigma). Cada poço contendo aproximadamente 10^6 células foi estimulado com 25µg/mL da proteína recombinante L31 e a placa foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Depois de 65 horas os sobrenadantes foram coletados e testados para a presença das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 e IL-5 utilizando a técnica CBA (Cytometric Bead Array) com o Kit da BD Biosciences (Mouse Th1/Th2 Cytokine), seguindo as instruções do fabricante.

Os dados foram adquiridos pelo citômetro de fluxo Accuri C6 utilizando o software CFlow Sampler. A análise desses dados foi realizada pelo software FCAP Array v3.0.

3.6.3 Desafio e determinação da bacteremia

Os camundongos do experimento quatro (Quadro 1) foram desafiados com 100 vezes a dose letal para matar 50% dos indivíduos (100DL₅₀) da cepa virulenta de *S. pneumoniae* sorotipo 4 (10^5 UFC), via intraperitoneal, sete dias após a última imunização. Dezoito horas após o desafio, cerca de 10µL de sangue dos camundongos foram coletados por via caudal, diluído 1:10 e 1:100 em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e semeados em placa de petri com meio de cultura Ágar Sangue. Essas placas foram incubadas a 35°C na presença de 5 a 10% de CO₂ por 24 horas. Após o período de incubação, o número de colônias isoladas que crescerem nas placas foram contadas para avaliação da bacteremia.

Os camundongos desafiados permaneceram sob observação para avaliação da sobrevida. Os gráficos e as análises estatísticas utilizando o teste de *Mann-whitney* ($P < 0,05$), foram feitos no programa *GraphPad Prism 4*.

4 RESULTADOS

4.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31

O gene que codifica a proteína ribossomal L31 (243pb) foi amplificado a partir da técnica de PCR. A análise do produto de PCR, mostrou a amplificação de um fragmento de DNA entre 200pb e 300pb, como esperado para o gene da proteína L31. Observou-se que não houve a amplificação de produtos inespecíficos e que o fragmento de DNA amplificado apresentou uma intensidade forte, demonstrando uma boa eficiência da reação de PCR (Fig.6).

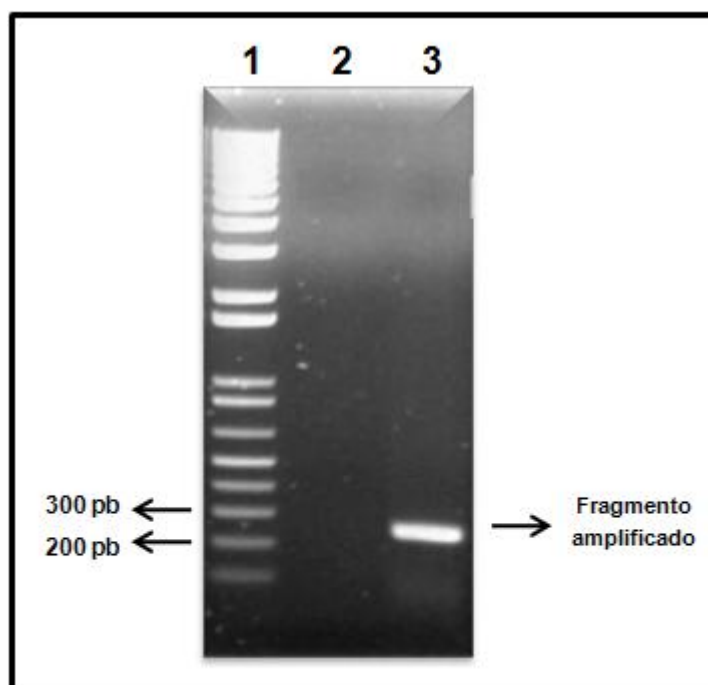


Figura 6. Análise da amplificação do gene que codifica a proteína ribossomal L31. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1, marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2, controle negativo da reação. Canaleta 3, produto da amplificação.

4.2 CLONAGEM DO GENE QUE CODIFICA A PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31

Para realizar a clonagem, primeiramente o plasmídeo pET-21a e o fragmento amplificado anteriormente foram digeridos com as enzimas *Nde I* e *Xho I*. A Figura 7 mostra que a digestão enzimática do plasmídeo foi bem sucedida, apresentando apenas uma banda, o que indica que foi linearizado. Para aumentar a eficiência da ligação, o plasmídeo digerido foi desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina de camarão.

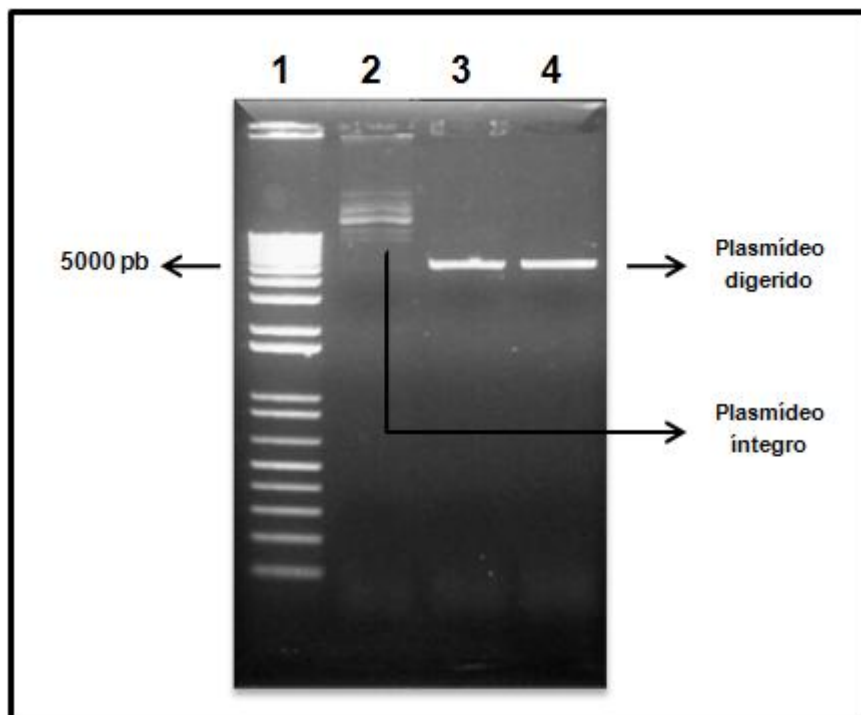


Figura 7. Análise da digestão enzimática do plasmídeo pET-21a com as enzimas *Nde I* e *Xho I*. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1, marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2, pET-21a íntegro. Canaleta 3, produto da digestão com a enzima *Nde I*. Canaleta 4, produto da digestão com a enzima *Xho I*.

Os produtos digeridos e purificados, correspondentes ao gene da proteína L31 e ao plasmídeo pET-21a foram submetidos a uma reação de ligação. O produto da ligação foi utilizado para transformar células competentes NM522. Após a transformação foram obtidas 66 colônias, das quais cinco foram submetidas a PCR de colônias para verificação da presença do gene da proteína L31. Como apresentado na Figura 8, todas as cinco colônias foram positivas para presença do gene da proteína L31. Na placa de controle positivo cresceram mais de 1000 colônias e na placa de controle negativo não houve crescimento.

Os plasmídeos desses cinco clones positivos foram extraídos e sequenciados. Foi possível analisar apenas um clone, pois foi o único com qualidade de sequenciamento que permitiu a análise da sequência do gene e de outras estruturas importantes para a transcrição/tradução presentes no plasmídeo (Fig.9). Todos os elementos, isto é, a sequência do gene, do promotor T7, do operador lac, do sítio de ligação ao ribossomo e da cauda de histidina estavam corretas. O alinhamento da sequência original com a sequência obtida, foi realizada pelo programa *ClustalW2* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>), mostrando que houve 100% de homologia (Fig.10).

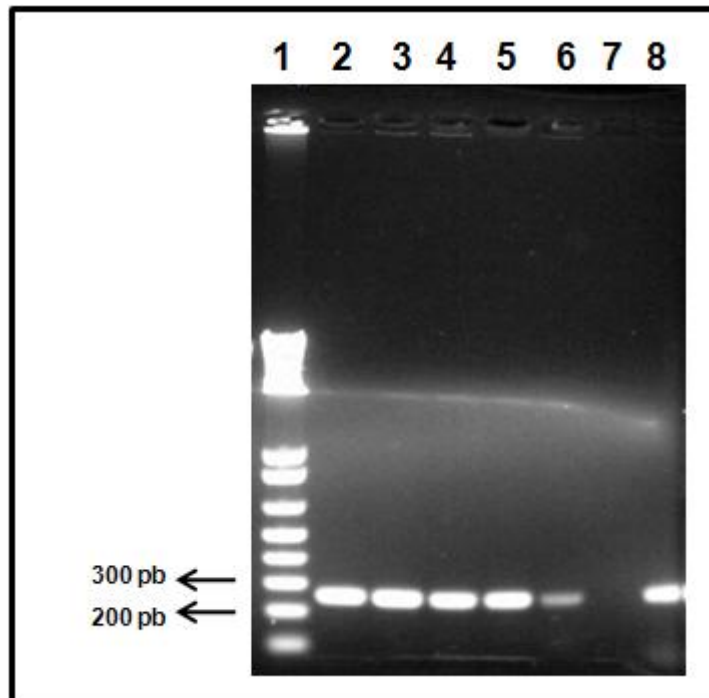


Figura 8. Análise da PCR de colônias para verificação da presença do gene da proteína L31. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaleta 1, marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaleta 2, 3, 4, 5 e 6, colônias 1 a 5 respectivamente. Canaleta 7, controle negativo da reação. Canaleta 8, controle positivo da reação.

Promotor T7	Operon lac
GATCTCGATCCCGCAAAT	<u>TAATACGACTCACTATA</u> GGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC
CTTTAAGAAGGAGATATACAT	<u>ATGAAAAA</u> GATATCCATCCAGAATATCGCCCAGTTGTCTTCATGGACACA <u>ACTACTGGTTACCA</u>
	<u>ATTCCTTAGCGGTTCA</u> CAAAA <u>CGCTCTAACGAAACAGTTGAGTTCGAAGGCGAAA</u> CTT <u>ATCCATTGATCCGTGTGGAAATTTCA</u>
	<u>TCAGACTCACCCATTCTACACTGGACGTCAAAAGTTCACTCAAGCAGATGGACGCGTGGATCGTTTCA</u> CAAAA <u>ATACGGT</u>
	<u>CTCAAA</u> CTCGAG <u>CACCACCACCACCAC</u> CTGAGA
	Cauda de Histidina

Figura 9. Análise do sequenciamento do gene da proteína L31. Sequências em negrito e sublinhada correspondem ao promotor T7, ao operador lac e a cauda de histidina. Em negrito e itálico, o gene da proteína L31.

```

Sequencia_Original      ATGAAAAAAGATATCCATCCAGAATATCGCCCAGTTGTCTTCATGGACAC 50
Plasmideo_Sequenciado  ATGAAAAAAGATATCCATCCAGAATATCGCCCAGTTGTCTTCATGGACAC 50
                        *****

Sequencia_Original      AACTACTGGTTACCAATTCCTTAGCGGTTCAACAAAACGCTCTAACGAAA 100
Plasmideo_Sequenciado  AACTACTGGTTACCAATTCCTTAGCGGTTCAACAAAACGCTCTAACGAAA 100
                        *****

Sequencia_Original      CAGTTGAGTTCGAAGGCGAAACTTACCCATTGATCCGTGTGGAAATTTCA 150
Plasmideo_Sequenciado  CAGTTGAGTTCGAAGGCGAAACTTACCCATTGATCCGTGTGGAAATTTCA 150
                        *****

Sequencia_Original      TCGACTCACACCCATTCTACACTGGACGTCAAAAGTTCACTCAAGCAGA 200
Plasmideo_Sequenciado  TCGACTCACACCCATTCTACACTGGACGTCAAAAGTTCACTCAAGCAGA 200
                        *****

Sequencia_Original      TGGACGCGTGGATCGTTTCAACAAAAAATACGGTCTCAA 240
Plasmideo_Sequenciado  TGGACGCGTGGATCGTTTCAACAAAAAATACGGTCTCAA 240
                        *****

```

Figura 10. Alinhamento da sequência nucleotídica do gene L31 no programa ClustalW2. O (*) indica bases iguais.

4.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31 RECOMBINANTE

Células competentes da linhagem BL21 foram transformadas com o plasmídeo pET-21a/L31 sequenciado. Um clone foi escolhido para testes de expressão, sendo identificado como clone1. Depois da indução, o clone1 apresentou uma boa expressão, mostrando claramente uma cinética ao longo do tempo, até 4 horas após a indução. A banda expressa apresentou um tamanho esperado para a proteína L31, entre 10 e 17kDa (Fig.11). A partir da análise da expressão foi determinado o tempo de 4 horas de indução como sendo o melhor para produção da proteína L31. Não foi preciso testar outros parâmetros, tais como, concentração IPTG, DO e temperatura de incubação.

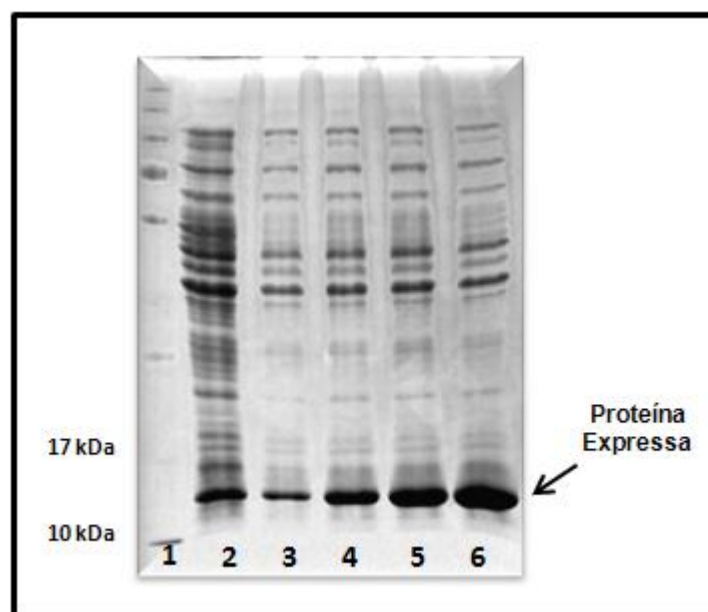


Figura 11. Análise da cinética de expressão da proteína L31 do clone1. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) corado com azul de coomassie. Canaleta 1, marcador de peso molecular PageRuler Plus (Fermentas). Canaleta 2, T₀ (sem IPTG). Canaleta 3, T₁ (1 hora de indução). Canaleta 4, T₂ (2 horas de indução). Canaleta 5, T₃ (3 horas de indução). Canaleta 6, T₄ (4 horas de indução).

4.4 PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RIBOSSOMAL L31 RECOMBINANTE

Seguiu-se os experimentos com o clone1 devido a sua eficiência na expressão da proteína L31. O produto obtido após 4 horas de expressão foi utilizado para determinar a solubilidade da proteína L31. A análise da determinação da solubilidade mostrou que a proteína apresentou-se na forma insolúvel (Fig.12).

Portanto antes de realizar a etapa de purificação, precisou-se realizar testes de solubilização com uréia. Foram testadas concentrações crescentes de uréia, de 2M a 5M. Observou-se que não houve diferenças significativas entre as concentrações testadas na solubilização, e que 2M de uréia foi suficiente para solubilizar a proteína L31 (Fig.12).

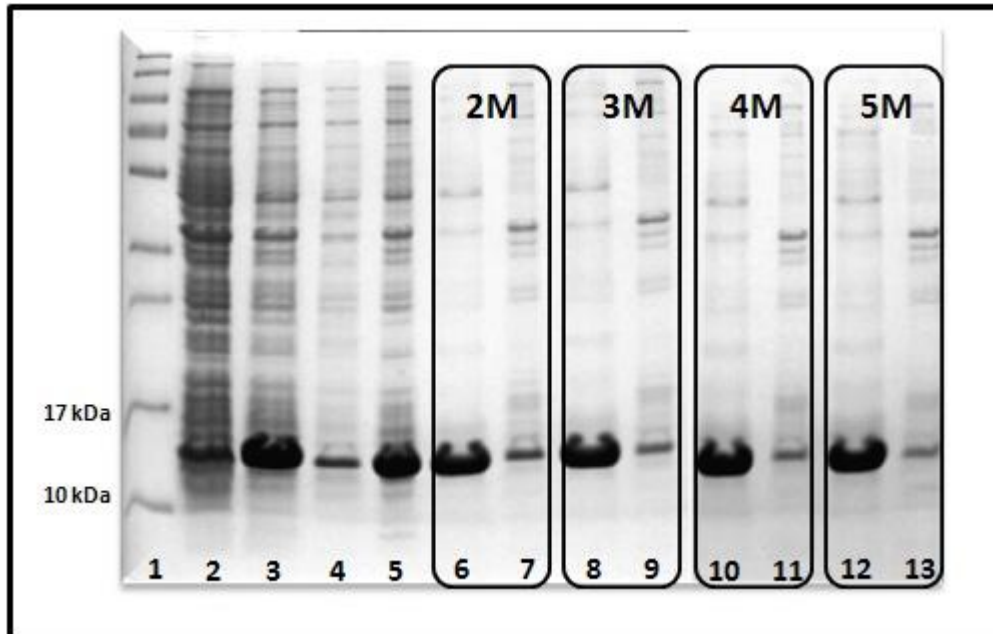


Figura 12. Análise da determinação da solubilidade e solubilização com uréia em diferentes concentrações da proteína L31 expressa. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) corado com azul de coomassie. Canaleta 1, marcador de peso molecular PageRuler Plus (Fermentas). Canaleta 2, T₀ (sem IPTG). Canaleta 3, T₄ (4 horas de indução). Canaleta 4, proteínas solúveis da determinação da solubilidade. Canaleta 5, proteínas insolúveis da determinação da solubilidade. Canaletas 6, 8, 10 e 12, proteínas solubilizadas com uréia nas concentrações de 2, 3, 4 e 5M, respectivamente. Canaletas 7, 9, 11 e 13, proteínas que permaneceram insolúveis após o tratamento com uréia nas concentrações de 2, 3, 4 e 5M, respectivamente.

Depois dos testes para determinar as melhores condições para solubilizar a proteína L31, foi feita uma nova expressão em maior escala (300mL), seguindo as mesmas proporções e condições da metodologia descrita anteriormente. A proteína L31 foi então solubilizada com uréia 2M e em seguida purificada por cromatografia de afinidade. A análise mostrou que a purificação foi bem sucedida apresentando apenas a banda de interesse (Fig. 13). Em cada corrida realizada, obteve-se 1mL da proteína purificada a uma concentração média de 0,8mg/mL.

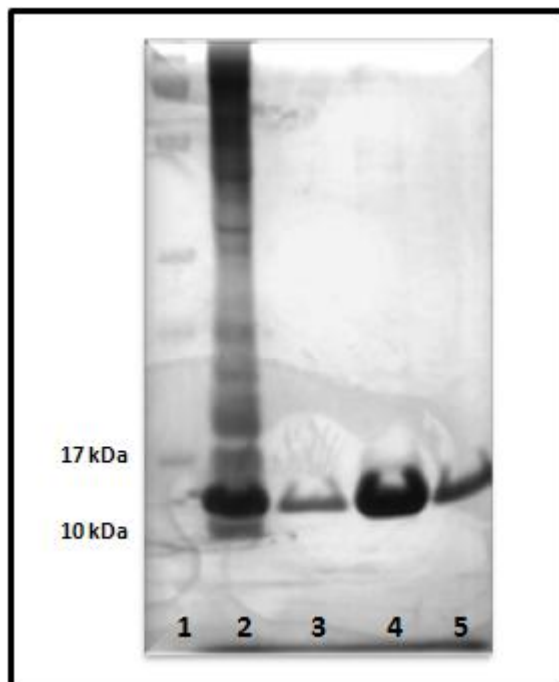


Figura 13. Análise da purificação da proteína L31. Eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE) corado pela prata. Canaleta 1, marcador de peso molecular PageRuler Plus (Fermentas). Canaleta 2, T₄ (4 horas de indução). Canaletas 3, 4 e 5, frações da purificação da proteína L31.

4.5 VERIFICAÇÃO DA PRESENÇA DA CAUDA DE HISTIDINA E DA IMUNOGENICIDADE DA PROTEÍNA L31 PURIFICADA

A cinética de expressão e o peso molecular apresentados pela proteína expressa são fortes indicadores que seja a proteína L31. Para confirmar mais um indicador, a proteína purificada foi submetida à técnica de Western Blot, utilizando o anticorpo específico Anti-His. O anticorpo reconheceu a proteína purificada, indicando a presença da cauda de histidina (Fig.14).

A imunogenicidade foi testada utilizando como anticorpo específico o soro de paciente com diagnóstico de meningite e soro hiperimune de coelho imunizado com proteína recombinante L31 (Fig. 15). Anticorpos presentes nos dois soros reconheceram a proteína, mostrando seu potencial imunogênico.

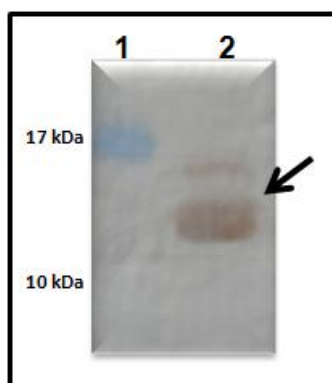


Figura 14. Western Blot para confirmação da identidade da proteína L31 purificada. Canaleta 1, marcador de peso molecular PageRuler Plus (Fermentas). Canaleta 2, proteína L31 revelada com anticorpos específicos Anti-His.

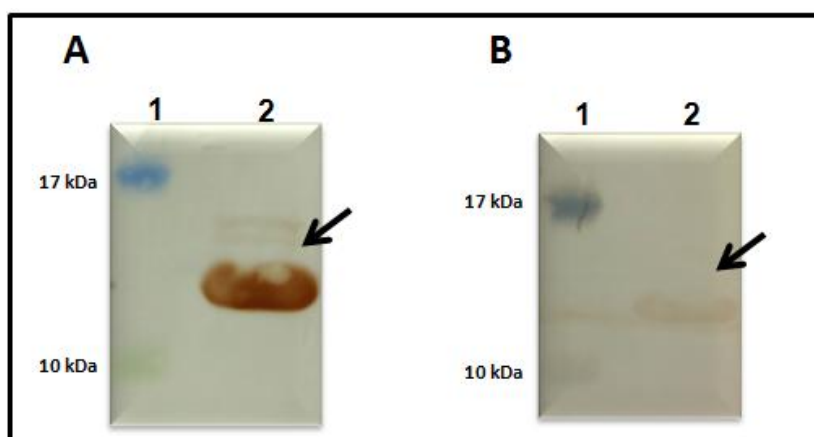


Figura 15. Western Blot para verificação da imunogenicidade da proteína L31 purificada. A) Canaleta 1, marcador de peso molecular PageRuler Plus (Fermentas). Canaleta 2, proteína L31 revelada com anticorpos presentes no soro de coelho imunizado com a proteína L31 recombinante. B) Canaleta 1, marcador de peso molecular PageRuler Plus (Fermentas). Canaleta 2, proteína L31 revelada com anticorpos presentes no soro de pacientes com diagnóstico de meningite.

4.6 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL

Foram realizados quatro experimentos, como mostrado no Quadro 1. No experimento 1, onde os animais foram imunizados por duas vias de administração, a avaliação da resposta humoral mostrou bons níveis de produção de anticorpos IgG anti L31 tanto pela via intraperitoneal quanto pela via subcutânea. Não houve diferença estatisticamente significativa, o que permitiu definir a via subcutânea como via de

administração para os experimentos subsequentes. A Figura 16 mostra os níveis de anticorpos IgG anti L31 do soro dos camundongos após de 7 dias da terceira imunização.

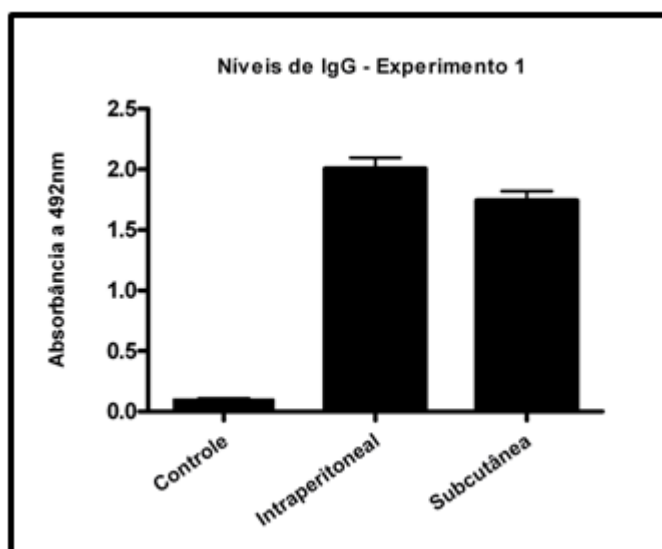


Figura 16. Níveis de anticorpos IgG anti L31 do soro de camundongos do experimento 1 após três imunizações. Comparação dos níveis de IgG entre os grupos Controle, Intraperitoneal e Subcutânea.

No experimento 2 a via de administração utilizada foi a subcutânea, estabelecida a partir do experimento 1. Nesse experimento utilizou-se dois adjuvantes diferentes, o Freund e a Microemulsão, e a quantidade de proteína foi reduzida na segunda e terceira imunizações. Foi analisada a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti L31 do soro dos camundongos após 7 dias da terceira imunização. A Figura 17 mostra a titulação de anticorpos IgG1 anti L31, revelando a produção de altos níveis desses anticorpos, tanto no grupo Freund quanto no grupo Microemulsão. Os níveis de IgG1 e IgG2a podem ser analisados na Figura 18, mostrando que a principal resposta foi a produção de IgG1, sendo estatisticamente significativo.

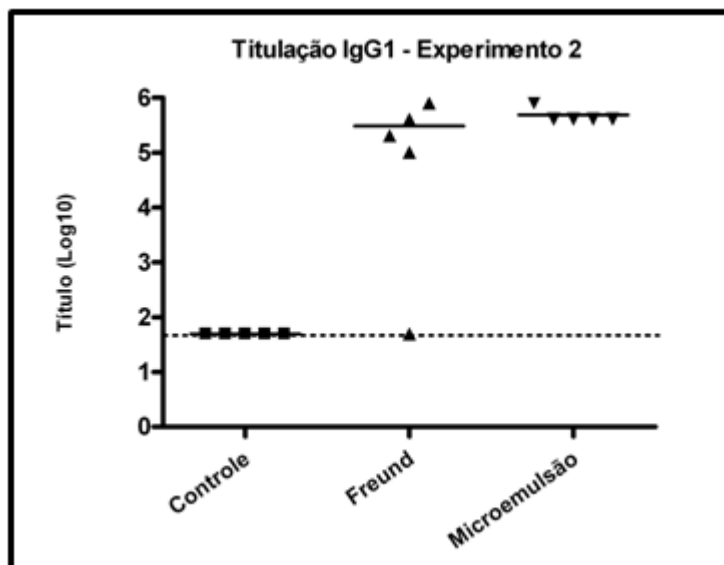


Figura 17. Titulação de anticorpos IgG1 anti L31 do soro de camundongos do experimento 2 após três imunizações. Os símbolos (quadrado, triângulo e triângulo invertido) representam os grupos Controle, Freund e Microemulsão, respectivamente. Cada um desses símbolos representa um indivíduo. As barras horizontais representam as médias de cada grupo. A linha pontilhada é o ponto de corte em relação ao grupo controle.

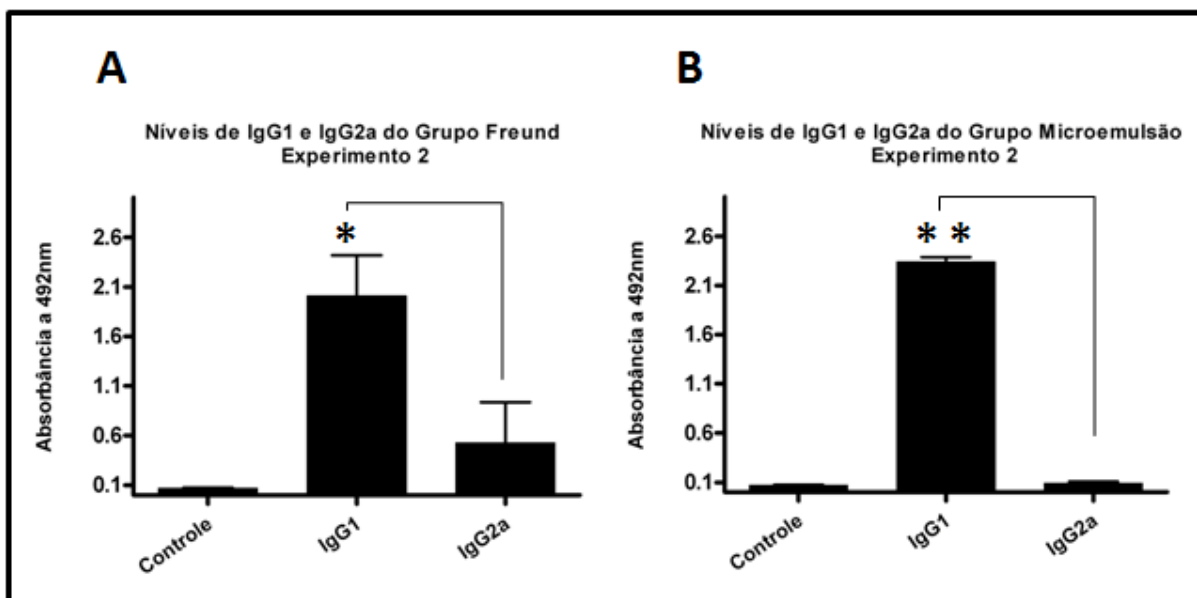


Figura 18. Níveis das subclasses de anticorpos IgG do soro de camundongos do experimento 2 após três imunizações. A) Comparação entre os níveis de IgG1 e IgG2a do grupo Freund. B) Comparação entre os níveis de IgG1 e IgG2a do grupo Microemulsão. (*) $p=0,0159$, (**) $p=0,0079$.

4.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

No experimento três foi analisada a produção de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-5) secretadas pelas células extraídas do baço dos camundongos imunizados (Grupo Freund) e não imunizados (Grupo Controle) pela proteína recombinante L31 (Fig.19). Quando comparado os níveis de produção de citocinas entre os grupos Controle e Freund, a única citocina que apresentou uma produção estatisticamente significativa foi a IL-5.

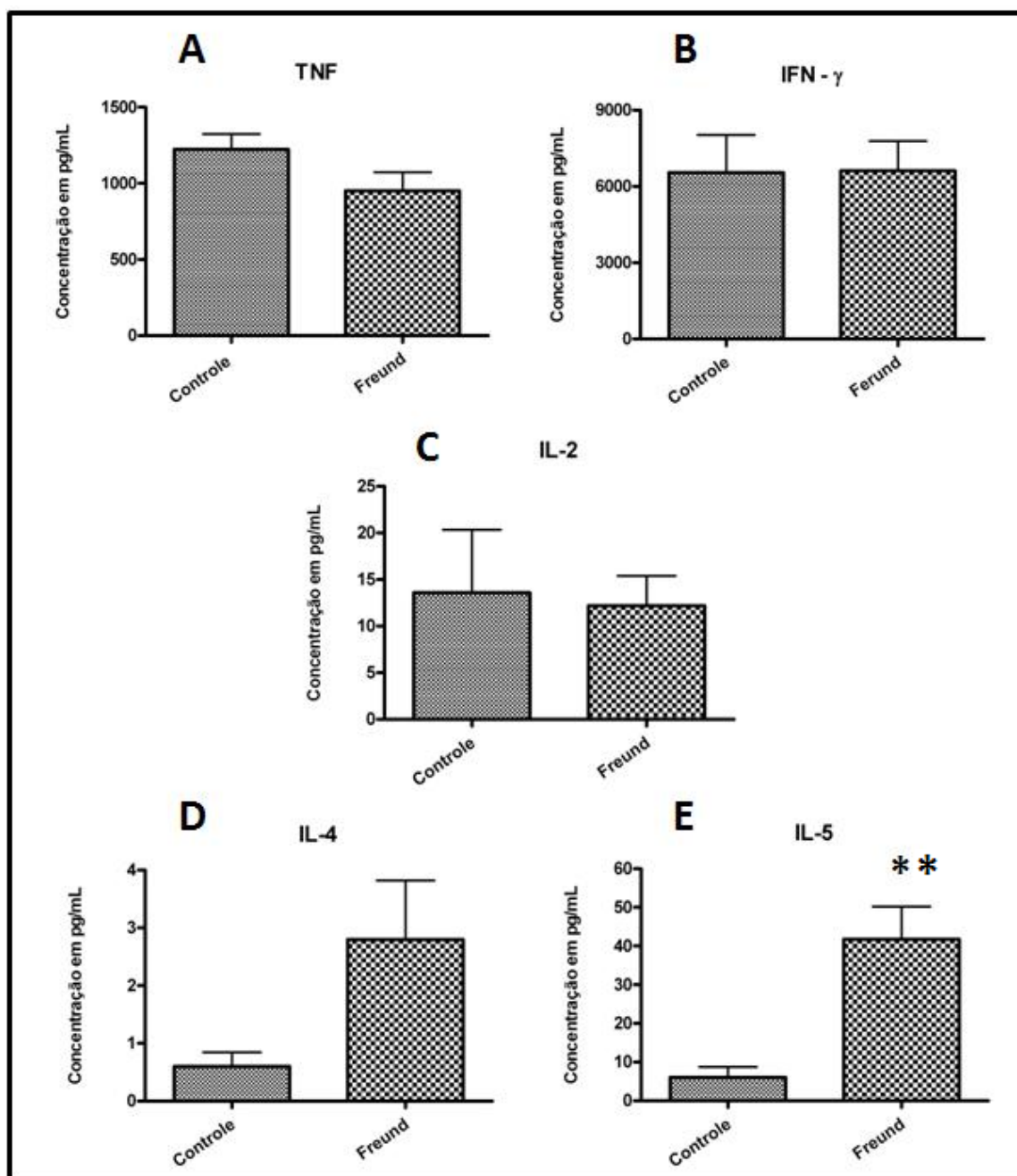


Figura 19. Análise dos níveis de produção de citocinas, comparando o grupo Controle e o Freund. A) Níveis de TNF- α . B) Níveis de IFN- γ . C) Níveis de IL-2. D) Níveis de IL-4. E) Níveis de IL5. (**) p=0,0079.

4.8 AVALIAÇÃO DA BACTEREMIA E SOBREVIDA DOS CAMUNDONGOS DESAFIADOS COM *S. pneumoniae*

Após dezoito horas do desafio (experimento 4), foi realizada uma coleta de sangue dos camundongos para determinação da bacteremia. Os grupos Freund e Microemulsão não apresentaram redução estatisticamente significativa na bacteremia em relação ao grupo Controle (Fig.20).

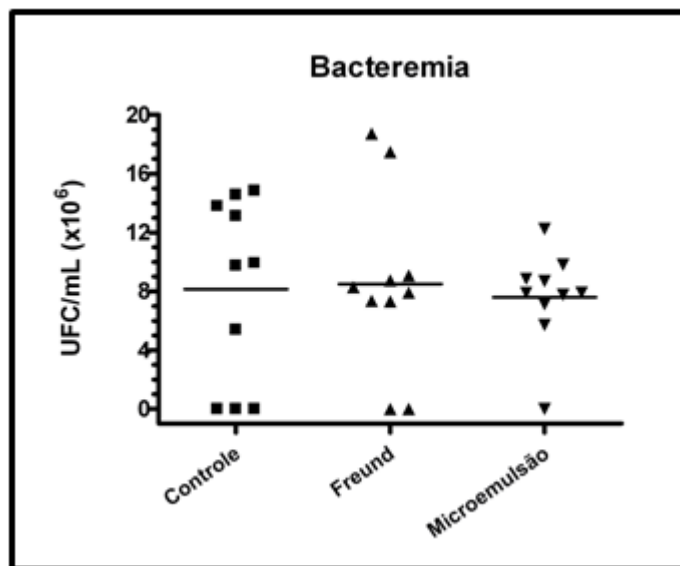


Figura 20. Análise da bacteremia após dezoito horas do desafio. Os símbolos (quadrado, triângulo e triângulo invertido) representam os grupos Controle, Freund e Microemulsão, respectivamente. Cada um desses símbolos representa um indivíduo. As barras horizontais representam as médias de cada grupo.

A Figura 21 mostra a análise da sobrevivência dos camundongos após o desafio. Observou-se que os grupos Freund e Microemulsão, imunizados com a proteína ribossomal L31 recombinante, não apresentaram maior sobrevivência quando comparados com o grupo Controle.

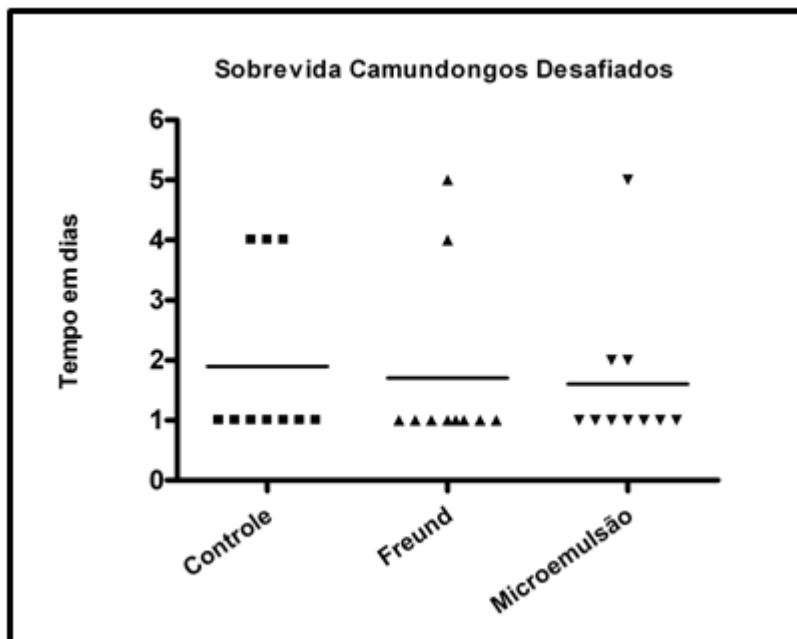


Figura 21. Análise da sobrevivência dos camundongos desafiados com *S. pneumoniae*. Os símbolos (quadrado, triângulo e triângulo invertido) representam os grupos Controle, Freund e Microemulsão, respectivamente. Cada um desses símbolos representa um indivíduo. As barras horizontais representam as médias de cada grupo.

5 DISCUSSÃO

Mesmo possuindo tratamento e prevenção, o *S. pneumoniae* é um microrganismo de importância mundial, devido às grandes taxas de morbidade e mortalidade causadas por ele. Por possuir mais de 90 sorotipos - que são determinados pela composição da cápsula polissacarídica - é difícil a produção de uma vacina que seja mais abrangente, ou seja, que proteja contra a maioria, ou se não, todos os sorotipos.

As vacinas comercializadas atualmente possuem limitações, ou não desencadeiam uma resposta de memória, ou abrangem poucos dos sorotipos existentes. Diante destas limitações, nos últimos anos, tem-se dado muita atenção ao desenvolvimento de vacinas protéicas que sejam altamente imunogênicas, T-dependentes, antigenicamente conservadas e que ofereçam proteção contra todos os sorotipos de *S. pneumoniae* (Hava & Camilli 2002; García-Suárez *et al.* 2004; Orihuela *et al.* 2004). Apesar de algumas proteínas terem mostrado resultados interessantes de proteção, nenhuma, até o momento, foi licenciada para uso em humanos, justificando a busca de mais candidatos.

A bioinformática vem se mostrando uma aliada importante na busca de novos antígenos protéicos, criando, por exemplo, softwares com capacidade de prever a localização celular de uma proteína, ou até mesmo se a proteína está envolvida em mecanismos de virulência (Garg & Gupta 2008). As proteínas identificadas, têm sido amplamente investigadas como antígenos protetores, mostrando bons resultados em diversos casos (Swiatlo & Ware, 2003). Essas proteínas são geralmente identificadas pela presença de um peptídeo sinal de secreção na porção N-terminal. No entanto, nos últimos anos, algumas adesinas presentes na superfície celular de bactérias gram-positivas, têm sido descritas por não possuírem uma sequência sinal, abrindo um novo campo de pesquisa de antígenos (Chhatwal, 2002). Além disso, vários estudos de proteômica tem identificado proteínas citoplasmáticas conhecidas - que não possuem um peptídeo sinal - na fração da parede celular (Geng *et al.* 2008; Morsczeck *et al.* 2008). Essas proteínas que não apresentam um peptídeo sinal clássico podem ser identificadas a partir de uma ferramenta de bioinformática chamada Secretome P (Bendtsen *et al.* 2004).

Um estudo realizado pelo Serviço de Biologia Molecular e Bioinformática da FUNED, realizou uma triagem de todos os genomas de *S. pneumoniae* disponíveis, cruzando as informações de vários tipos de programas computacionais. Neste estudo foram identificados antígenos protéicos de superfície conservados entre os vários sorotipos, apresentando ou não o peptídeo sinal clássico. A partir desse estudo, alguns dos antígenos protéicos identificados foram clonados e testados quanto à expressão e purificação. Diante desses

testes, apenas a proteína ribossomal L31 apresentou um bom rendimento, direcionando o nosso foco de estudo para a mesma.

As proteínas ribossomais, presentes e altamente conservadas em todos os organismos, têm um papel crucial na síntese de proteínas, tendo uma localização citoplasmática. Entretanto, várias proteínas conhecidas como sendo citoplasmática, como por exemplo, a 6-fosfogluconate dehidrogenase e a enolase, já foram identificadas na superfície do gênero *Streptococcus* e mostraram proteção em camundongos (Zhang *et al.* 2009; Tan *et al.* 2008), sugerindo que uma mesma proteína poderia ter localização e papel diferente dentro do mesmo microorganismo. Além disso, uma recente análise proteômica de *Streptococcus pyogenes*, identificou proteínas ribossomais expostas na superfície da bactéria, tais como, S8 (30S), L5 (50S) e L11 (50S) (Severin *et al.* 2007). Proteínas ribossomais foram também detectadas na superfície de *Listeria monocytogenes* (Lenz *et al.* 2003), sugerindo que ao menos em bactéria gram-positiva, esta presença poderia ser um fenômeno comum. Neste sentido, o estudo da proteína ribossomal L31, assim como de outras proteínas dessa mesma classe é de grande relevância, tendo em vista que outras proteínas ribossomais como L22 e S19, L7/L12 já mostraram capacidade protetora contra *Leishmania major* e *Brucella abortus*, respectivamente (Mallick *et al.* 2007; Iborra *et al.* 2008).

No presente trabalho, a proteína ribossomal L31 recombinante foi então submetida a testes para avaliação do seu potencial como vacina protéica, revelando-se como uma proteína altamente imunogênica. Apesar da sua capacidade de induzir uma alta resposta humoral, não foi capaz de proteger contra o desafio com *S. pneumoniae* em modelo de sepse.

Entre os possíveis fatores afetando a capacidade de proteção, podemos citar a exposição da proteína. Como relatado anteriormente, vários estudos através de análises proteômicas já identificaram a presença de proteínas ribossomais expostas na superfície celular. No entanto, em nosso estudo, a presença da proteína ribossomal L31 na superfície foi realizada apenas por análise *in silico*, ou seja, por meio de uma simulação computacional, não garantindo 100% de acerto. Para validar esta análise *in silico*, experimentos futuros deverão ser realizados com o objetivo de confirmar a presença da proteína L31 na superfície do *S. pneumoniae*. Além disso, partindo do pressuposto que a proteína L31 esteja exposta na superfície, não sabemos o grau dessa exposição. Por exemplo, devido à complexa estrutura do *S. pneumoniae* e por se tratar de uma proteína pequena, ela poderia estar na superfície, mas mascarada pela cápsula e inacessível aos anticorpos. Isso poderia explicar, pelo menos parcialmente, que a proteína L31 não foi capaz de induzir proteção contra o *S. pneumoniae*.

Outro fator a ser levado em consideração é a conformação da proteína. Por se apresentar na forma insolúvel (corpos de inclusão), foi necessária sua solubilização com uréia 2M, levando a desnaturação da mesma. Neste processo de desnaturação, a proteína perde sua conformação nativa, podendo perder epítomos conformacionais. Na purificação realizada, a uréia foi retirada, mas não foi utilizado tampões para renaturação. Como a proteína L31 não possui uma atividade facilmente detectável, como por exemplo, uma atividade enzimática, seria difícil avaliar se a renaturação ocorreu. Alguns estudos revelam que a desnaturação pode ou não afetar o potencial imunogênico de uma proteína. Por exemplo, no estudo realizado por Gilmore & Mbow (1999) com objetivo de avaliar a capacidade protetora da proteína OspC contra *Borrelia burgdorferi*, concluíram que a proteína na forma nativa foi capaz de induzir proteção, enquanto na forma desnaturada não. Já o trabalho realizado por Goodin & colaboradores (2007), mostrou que a utilização de proteínas de *Yersinia pestis* expressas em *E. coli* na forma de corpos de inclusão e solubilizadas com uréia, foram capazes de conferir proteção contra infecção induzida por *Y. pestis*. Em nosso trabalho, a utilização da proteína L31 na forma desnaturada, não provocou a perda de sua imunogenicidade, tendo em vista que a proteína L31 quando submetida a Western blot, foi reconhecida por anticorpos presentes no soro de pacientes com diagnóstico de meningite.

Os primeiros indícios da imunogenicidade da proteína ribossomal L31 foram obtidos com a realização de um Western Blot, mostrando que os anticorpos presentes tanto no soro de paciente com diagnóstico de meningite, quanto no soro de coelho imunizado com a proteína L31, foram capazes de reconhecer a mesma. Com a realização dos experimentos em camundongos, verificou-se a produção de bons níveis de anticorpos IgG anti L31 após a terceira imunização, reafirmando o potencial imunogênico da proteína L31.

O *S. pneumoniae* é um patógeno bacteriano extracelular, cuja proteção do hospedeiro é conferida principalmente pela produção de anticorpos, que agem como opsoninas, aumentando a fagocitose pela via clássica do sistema do complemento e determinando sua morte, sendo um dos principais mecanismos efetores da imunidade humoral e inata (Bricks, 1994). Suas principais funções efetoras são promover a fagocitose de microrganismos, estimular a inflamação e induzir a lise celular desses microrganismos, tendo grande importância na defesa do hospedeiro contra bactérias encapsuladas, a qual é mediada pela imunidade humoral (Abbas *et al.* 2008; Delves *et al.* 2011). A opsonofagocitose, portanto, constitui um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra pneumococos invasivos, onde pacientes com deficiências tanto dos componentes iniciais da via clássica (C1q e C2) como de C3 possuem alto risco de apresentarem doença pneumocócica (Yuste *et al.* 2008; Kang *et al.* 2006). A importância dos anticorpos específicos na redução da bacteremia e na indução de proteção contra o *S. pneumoniae*, foi

confirmada por meio de estudos utilizando a imunização passiva em modelos de sepse e pneumonia (Cao *et al.* 2007; Gianfaldoni *et al.* 2009; Cohen *et al.* 2011).

No entanto, parece que a subclasse de anticorpos IgG produzidos, afetam o nível de proteção obtida. Estudos com as proteínas de superfície PiaA e PiuA, mostraram a produção de elevados títulos de IgG1 e também IgG2a, levando a indução de uma proteção parcial (Jomaa *et al.* 2006). Uma correlação positiva foi também observada no soro de camundongos que continham um maior equilíbrio entre a produção de IgG1/IgG2a, indicando a importância de IgG2a na deposição de C3, e conseqüentemente, sua importância para a proteção (Ferreira *et al.* 2008; Xu *et al.* 2011). Em nossos experimentos, os títulos de anticorpos IgG1 anti L31 foram muito altos, chegando até 1:819.200. No entanto, praticamente não se detectou presença de IgG2a, podendo explicar pelo menos parcialmente, a ausência de proteção em camundongos.

Por motivo ético, testou-se outra formulação adjuvante, a microemulsão, uma vez que o uso do adjuvante de Freund vem sendo abolido, devido a sua associação com uma variedade de lesões, incluindo granulomas no local das injeções, gerando dor e desconforto animal (Stills, 2005). A microemulsão foi desenvolvida na FUNED, originalmente para melhorar a produção do soro antirrábico. Em camundongos, a potência do soro obtido após imunização com o vírus rábico na forma de microemulsão se mostrou mais potente do que o adjuvante de Freund e o hidróxido de alumínio. Além disso, a microemulsão não mostrou nenhuma alteração histopatológica nos tecidos dos camundongos ao contrário do adjuvante de Freund (Leclercq *et al.* 2011). Neste trabalho, a microemulsão mostrou-se como sendo um bom adjuvante, levando a uma produção de elevados níveis de anticorpos IgG. E como visto anteriormente não causou lesão local nos animais quando comparada com o adjuvante de Freund. No entanto, tanto a microemulsão quanto o adjuvante de Freund não levaram a um melhor balanço IgG1/IgG2a e também não induziram proteção nos animais desafiados.

Apesar da resposta imune humoral ser considerada a mais importante para proteção contra o *S. pneumoniae*, não pode se excluir a participação de uma resposta celular através da produção de citocinas. Um estudo realizado por Jomaa e colaboradores (2006), mostrou o potencial protetor das proteínas PiaA e PiuA, em modelo de infecção respiratória com *S. pneumoniae*. A proteção parcial gerada por essas duas proteínas foi atribuída a produção balanceada de IgG1/IgG2a e a indução principalmente de uma resposta Th1, com a produção de altos níveis de IFN- γ . Outro estudo avaliou as repostas imune humoral e celular em camundongos imunizados pela via nasal com as proteínas PspA ou PspC. Após o desafio respiratório por pneumococo, apenas a proteína PspA conferiu proteção, levando a indução de anticorpos com perfil Th1 e a secreção de citocinas IL-17 e IFN- γ (Oliveira, 2009). Dentre as citocinas avaliadas neste trabalho, a única que apresentou uma produção estatisticamente significativa, quando comparados os grupos Controle (imunizado PBS) e

Freund (imunizado L31), foi a IL-5. A IL-5 é considerada um fator de proliferação de Linfócitos B do tipo Th2, coerente com a detecção de uma alta produção de IgG1. Não foi detectada a produção de IFN- γ , podendo explicar a falta de produção de IgG2a e ausência de proteção.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSÕES

Com a análise dos resultados apresentados no presente trabalho, foi possível chegar as seguintes conclusões:

- ✓ O gene da proteína ribossomal L31 de *S. pneumoniae* foi clonado com êxito no plasmídeo pET-21a, sendo confirmado por meio de PCR e sequenciamento.
- ✓ A proteína L31 foi expressa na forma recombinante e purificada com sucesso, apresentando um bom rendimento, tanto na expressão quanto na purificação.
- ✓ A proteína L31 se mostrou altamente imunogênica, comprovada por Western Blot e pela avaliação da resposta humoral.
- ✓ A avaliação da resposta celular mostrou que apenas a produção da citocina IL-5 foi estatisticamente significativa, indicando um perfil de resposta Th2.
- ✓ Apesar da proteína ser altamente imunogênica, apresentando títulos elevados de IgG1, não foi suficiente para reduzir a bacteremia e induzir uma proteção contra o desafio com *S. pneumoniae*.

6.2 PERSPECTIVAS

- ✓ Continuar os estudos em busca de outras proteínas imunogênicas, dentro das selecionadas pelos estudos de bioinformática, com o objetivo de avaliar sua capacidade de proteção contra o *S. pneumoniae*. Com a identificação de outras proteínas os estudos para avaliação da imunogenicidade e proteção poderão ser feitos não apenas com uma proteína, e sim com combinações de diferentes proteínas, aumentando as chances de proteção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

Adamou JE, Heinrichs JH, Erwin AL. Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis. **Infection and Immunity** 2001; 69: 949-958.

Balachandran P, Brooks-Walter A, Virolainen-Julkunen A, Hollingshead SK, Briles DE. 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.

Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Von Heijne G, Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. **Protein Engineering Design & Selection** 2004; 17(4): 349-356.

Bentley SD, Aanensen DM, Mavroidi A, Saunders D, Rabinowitsch E, Collins M, Donohoe K, Harris D, Murphy L, Quail MA, Samuel G, Skovsted IC, Kalltoft MS, Barrell B, Reeves PR, Parkhill J, Spratt BG. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. **PLOS Medicine** 2006; 2(3): 262-269.

Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JRI. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. **The Pediatric Infectious Disease Journal** 2000; 19: 187-195.

Brandileone MCC. **Distribuição de sorotipos, resistência antimicrobiana e perfil molecular de *Streptococcus pneumoniae* isolado de doença invasiva no Brasil: 1993-1998**. 1999. Tese. (Doutorado em Medicina). Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1999.

Bricks LF. Vacina Anti-Pneumocócica: eficácia em diferentes grupos de risco e recentes avanços no desenvolvimento de uma vacina mais imunogênica – Atualização. **Jornal de Pediatria** 1994; 70(2): 75-81.

Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ, Isaacman DJ. *Streptococcus pneumoniae*: description of the pathogen, disease epidemiology, treatment and prevention. **Pharmacotherapy** 2005; 25: 1193-1212.

Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, Ferguson LM, Nahm MH, Nabors GS. Immunization of humans with recombinant pneumococcal surface protein A (rPspA) elicits Abs that passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* Bearing Heterologous PspA. **The Journal of Infectious Diseases** 2000; 182:1694-1701.

Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC, Ades EW, Novak L, van Ginkel FW, Benjamin WH. Immunizations with Pneumococcal Surface Protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases** 2003; 188: 339-348.

Cao J, Chen D, Xu W, Chen T, Xu S, Luo J, Zhao Q, Liu B, Wang D, Zhang X, Shan Y, Yin Y. Enhanced protection against pneumococcal infection elicited by immunization with the combination of PspA, PspC and ClpP. **Vaccines** 2007; 25: 4996-5005.

Cao J, Chen T, Li D, Wong CK, Chen D, Xu W, Zhang X, Lam CWK, Yin Y. Mucosal immunization with purified ClpP could elicit protective efficacy against pneumococcal pneumonia and sepsis in mice. **Microbes and Infection** 2008; 10: 1536-1542.

Carvalho V, Leclercq SY, Alvarenga MM. PIDIP- A pipeline for the discovery of immunogen protein candidates for a *Streptococcus pneumoniae* vaccine. In: 6th **Internacional Conference of the Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology** 2010, Ouro Preto. X- Meeting Abstracts 2010, 2010.

Centers for disease control and prevention - **Active bacterial core surveillance (ABCs) report emerging infections program network *Streptococcus pneumoniae*, 2008.** [online]. [capturado em 16 dez. 2012]. Disponível em: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/spneu08.pdf>.

Chhatwal GS. Anchorless adhesins and invasins of Grampositive bacteria: a new class of virulence factors. **Trends in Microbiology** 2002; 10(5): 205-208.

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

Dave S, Carmicle S, Hammerschmidt. Dual roles of PspC, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, in binding human secretory IgA and factor H. **The Journal of Immunology** 2004; 173: 471-477.

Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. **Roitt's Essential Immunology**. 12 ed. Malden (MA): Wiley-Blackwell, 2011.

Eskola J, Black S, Shinefield H, Plotkin SA, Orenstein WA. Pneumococcal Conjugate Vaccines. **Vaccines**. 4 ed. Philadelphia - Elsevier, 2004; 589-624.

Fedson DS, Musher DM. Pneumococcal polysaccharide vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA. Vaccines. 4th ed. Philadelphia: **WB Saunders** 2004; 529-588.

Feldhahn M, Thiel P, Schuler MM, Hillen N, Stevanovic S, Rammensee HG, Kohlbacher O. EpiToolKit- a web server for computational immunomics. **Nucleic Acids Research** 2008; 36: 519-522.

Ferreira DM, Darrieux M, Oliveira ML, Leite LC, Miyaji EN. 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.

FIOCRUZ - **Doenças pneumocócicas: informações técnicas**. [online]. [capturado em 19 nov. 2012]. Disponível em:
<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infolid=2792&sid=9>.

Frolet C, Beniazza M, Roux L, Gallet B, Noirclerc-Savoye M, Vernet T, Di Guilmi AM. New adhesion functions of surface-exposed pneumococcal proteins. **BMC Microbiology** 2010, 10(190): 1-13.

García-Suárez MM, Cima-Cabal MD, Florez N, Garcia P, Cernuda-Cernuda R, Astuillo A. Protection against pneumococcal pneumoniae in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin. **Infection and Immunity** 2004; 72(8): 4534-4540.

Garg A, Gupta D. VirulentPred: a SMV based prediction method for virulent proteins in bacterial pathogens. **BMC Bioinformatics** 2008; 9: 62-73.

Geng H, Zhu L, Yuan Y, Zhang W, Li W, Wang J, Zheng Y, Wei K, Cao W, Wang H, Jiang Y. Identification and characterization of novel immunogenic proteins of *Streptococcus suis* serotype 2. **Journal of Proteome Research** 2008; 7(9): 4132-4142.

Gianfaldoni C, Maccari S, Pancotto L, Rossi G, Hilleringmann M, Pansegrau W, Sinisi A, Moschioni M, Masignani V, Rappuoli R, Giudice GD, Ruggiero P. Sortase A Confers

Protection against *Streptococcus pneumoniae* in mice. **Infection and Immunity** 2009; 77(7): 2957-2961.

Gilmore RD, Mbow ML. Conformational nature of the *Borrelia burgdorferi* B31 outer surface protein C protective epitope. **Infection and Immunity** 1999; 67(10): 5463-5469.

Goodin JL, Nellis DF, Powell BS, Vyas VV, Enama JT, Wang LC, Clark PK, Giardina SL, Adamovicz JJ, Michiel DF. Purification and protective efficacy of monomeric and modified *Yersinia pestis* capsular F1-V antigen fusion proteins for vaccination against plague. **Protein Expression and Purification** 2007; 53(1):63-79.

Hava DL, Camilli A. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. **Molecular Microbiology** 2002; 45(5): 1389-1405.

Hirst RA, Gosai B, Rutman A, Guerin CJ, Nicotera P, Andrew PW, O'Callaghan C. *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. **The Journal of Infectious Diseases** 2008; 197: 744-751.

Huang S, Platt R, Rifas-Shiman S, Pelton S, Goldmann D, Jonathan A, Finkelstein JA. Post-PCV7 Changes in Colonizing Pneumococcal Serotypes in 16 Massachusetts Communities, 2001 and 2004. **Pediatrics** 2005; 116: 408-413.

Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. **Infection and Immunity** 2010; 78(2): 704-715.

Iborra S, Parody N, Abánades DR, Bonay P, Prates D, Novais FO, Barral-Netto M, Alonso C, Soto M. Vaccination with the *Leishmania major* ribosomal protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous leishmaniasis in mice. **Microbes and Infection** 2008; 10: 1133-1141.

Johnson HL, Deloria-Knoll M, Levine OS, Stoszek SK, Hance LF, Reithinger R, Muenz LR, O'Brien KL. Systematic evaluation of serotypes causing invasive pneumococcal disease among children under five: the pneumococcal global serotype project. **PLOS Medicine** 2010; 7(10): 1-13.

Jomaa M, Terry S, Hale C, Jones C, Douganc G, Brownd J. Immunization with the iron uptake ABC transporter proteins PiaA and PiuA prevents respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae*. **Vaccine** 2006; 24: 5133-5139.

Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. **Nature Reviews Microbiology** 2008; 6: 288-301.

Kang YS, Do Y, Lee HK, Park SH, Cheong C, Lynch RM, Loeffler JM, Steinman RM, Park CG. A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. **Cell** 2006; 125(1): 47-58.

Leclercq SY, dos Santos RM, Macedo LB, Campos PC, Ferreira TC, de Almeida JG, Seniuk JG, Serakides R, Silva-Cunha A, Fialho SL. Evaluation of water-in-oil-in-water multiple emulsion and microemulsion as potential adjuvants for immunization with rabies antigen. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 2011; 43(5): 378-385.

Lenz LL, Mohammadi S, Geissler A, Portnoy DA. SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **PNAS** 2003; 100(21): 12432-12437.

Liu C, Xiong X, Xu W, Sun J, Wang L, Li J. Serotypes and patterns of antibiotic resistance in strains causing invasive pneumococcal disease in children less than 5 years of age. **PLOS One** 2013; 8(1): 1-5.

Malley R, Lipsitch M, Stack A, Saladino R, Fleischer G, Pelton S. Intranasal immunization with killed unencapsulated whole cells prevents colonization and invasive disease by encapsulated pneumococci. **Infection and Immunity** 2001; 69: 4870-4873.

Mallick AI, Singha H, Chaudhuri P, Nadeem A, Khan AS, Dar KA, Owais M. Liposomised recombinant ribosomal L7/L12 protein protects Balb/c mice against *Brucella abortus* 544 infection. **Vaccine** 2007; 25: 3692-3704.

Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG. Infectious diseases society of America/American thoracic society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. **Clinical Infectious Diseases** 2007; 44: 27-72.

Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. **Journal of Molecular Recognition** 2008; 21: 243-255.

Moffitt KL, Malley R. Next generation pneumococcal vaccines. **Current Opinion in Immunology** 2011; 23(3): 407-413.

Morscheck C, Prokhorova T, Sigh J, Pfeiffer M, Bille-Nielsen M, Petersen J, Boysen A, Kofoed T, Frimodt-Møller N, Nyborg-Nielsen P, Schrotz-King P. *Streptococcus pneumoniae*: proteomics of surface proteins for vaccine development. **Clinical Microbiology and Infection** 2008; 14(1): 74-81.

Nabors GS, Braun PA, Herrmann DJ, Heise ML, Pyle DJ, Gravenstein S, Schiling M, Ferguson LM, Hollingshead SK, Briles DE, Becker RS. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive Abs to heterologous PspA molecules. **Vaccine** 2000; 18: 1743-1754.

Ogunniyi AD, Folland RL, Briles DE, Hollingshead SK, Paton JC. Immunization of mice with combinations of pneumococcal virulence proteins elicits enhanced protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and immunity** 2000; 68(5): 3028-3033.

Ogunniyi AD, Grabowicz M, Briles DE, Cook J, Paton JC. 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.

Oliveira MLS. **Caracterização da resposta imune sistêmica e de mucosa induzida por vacinas nasais compostas pelas proteínas da superfície de pneumococo PspA e PspC contra desafio respiratório por pneumococo em camundongos**. [online]. [capturado em 15 dez. 2012]. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/38675/caracterizacao-resposta-imune-sistemica-mucosa/>.

Orihuela CJ, Gao GL, Francis KP, Yu J, Tuomanen EI. Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. **Journal of Infectious Diseases** 2004; 190(1): 1661-1669.

Portal da Saúde – Ministério da Saúde (A) – **Proposta para introdução da vacina pneumocócica 10-valente (conjugada) no calendário básico de vacinação da criança**. [online]. [capturado em 15 nov. 2012]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/intro_pneumococica10_val_04_02_10_ver_final.pdf.

Portal da Saúde – Ministério da Saúde (B) – **Calendário básico de vacinação da criança**. [online]. [capturado em 27 nov. 2012]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21462.

Robinson KA, Baughman W, Rothrock G, Barrett N, Pass M, Lexau C, Damaske B, Stefonek K, Barnes B, Patterson J, Zell ER, Schuchat A, Whitney CG. Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in the United State, 1995-1998. **JAMA** 2001; 285(13): 1729-1735.

Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. **World Health Organization Bulletin** 2008; 86: 408-418.

Sabin Vaccine Institute -**The burden of pneumococcal disease and cost-effectiveness of a pneumococcal vaccine in latin america and the caribbean: a review of the evidence and a preliminary economic analysis, 2007.** [online]. [capturado em 19 dez. 2012].

Disponível em: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/document1.pdf>.

Severin A, Nickbarg E, Wooters J, Quazi SA, Matsuka YV, Murphy E, Moutsatsos IK, Zagursky RJ, Olmsted SB. Proteomic analysis and identification of *Streptococcus pyogenes* surface-associated proteins. **The Journal of Bacteriology** 2007; 189: 1514-1522.

Singleton RJ, Hennessy TW, Bulkow L. Invasive pneumococcal disease caused by nonvaccine serotypes among Alaska native children with high levels of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine coverage. **JAMA** 2007; 297: 1784-92.

Sociedade Brasileira de Imunizações - **Doença Pneumocócica Invasiva (DPI): importância e impacto na saúde.** [online]. [capturado em 18 jul. 2012]. Disponível em: http://www.sbim.org.br/sbim_info_doenca_pneumococica.pdf.

Stills HF Jr. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **The ILAR Journal Institute for Laboratory Animal Research** 2005; 46(3): 280-93.

Swiatlo E, Ware D. Novel vaccines strategies with protein antigens of *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 2003; 38(1): 1-7.

Talkington DF, Brown BG, Tharpe JA, Koenig A, Russell H. Protection of mice against fatal pneumococcal challenge by immunization with pneumococcal surface adhesin A (PsaA). **Microbial Pathogenesis** 1996; 21: 17-22.

Tan C, Fu S, Liu M, Jin M, Liu J, Bei W, Chen H. Cloning, expression and characterization of a cell wall surface protein, 6-phosphogluconate-dehydrogenase, of *Streptococcus suis* serotype 2. **Veterinary Microbiology** 2008; 130: 363-370.

Velasco EA, Verheula AFM, Verhoef J, Snippe H. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. **Microbiological Reviews** 1995; 59(4): 591-603.

Viratyosin W, Ingsriswang S, Pacharawongsakda E, Palittapongarnpim P. Genome-wide subcellular localization of putative outer membrane and extracellular proteins in *Leptospira interrogans* serovar Lai genome using bioinformatics approaches. **BMC Genomics** 2008; 9:181-96.

Wizemann TM, Heinrichs JH, Adamou JE, Erwin AL, Kunsch C, Choi GH, Barash SC, Rosen CA, Masure HR, Tuomanen E, Gayle A, Brewah YA, Walsh W. Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infection and Immunity** 2001; 69: 1593-1598.

World Health Organization (A) - **Acute Respiratory Infections**. [online]. [capturado em 19 dez. 2012]. Disponível em: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/ari/en/index3.html.

World Health Organization (B) - **Pneumococcal disease**. [online]. [capturado em 21 dez. 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/ith/diseases/pneumococcal/en/>.

World Health Organization (C) - **Pneumococcal disease**. [online]. [capturado em 02 dez. 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/ith/vaccines/pneumococcal/en/index.html>.

Wu HY, Nahm MH, Guo Y, Russell MW, Briles DE. 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: 839-46.

Xu J, Dai W, Wang Z, Chen B, Li Z, Fan X. Intranasal vaccination with chitosan-DNA nanoparticles expressing pneumococcal surface antigen a protects mice against nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. **Clinical and Vaccine Immunology** 2011; 18(1): 75-81.

Yuste J, Sen A, Truedsson L, Jönsson G, Tay LS, Hyams C, Baxendale HE, Goldblatt F, Botto M, Brown JS. 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.

Zhang A, Chen B, Mu X, Li R, Zheng P, Zhao Y, Chen H, Jin M. Identification and characterization of a novel protective antigen, Enolase of *Streptococcus suis* serotype 2. **Vaccine** 2009; 27(9): 1348-1353.

Zaidi AKM, Thaver D, Ali SA, Khan TA. Pathogens associated with sepsis in newborns and young infants in developing countries. **The Pediatric Infectious Diseases Journal** 2009; 28(1): 10-11.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 135/2009**, relativo ao projeto intitulado "*Identificação de novos antígenos conservados para desenvolvimento de uma vacina contra Streptococcus pneumoniae: in silico e in vitro screening*", que tem como responsável(is) **Sophie Yvette Leclercq**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 10/2009**.

Este certificado expira-se em **28/ 10/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 135/2009**, related to the project entitled "*Search for Streptococcus pneumoniae new conserved antigens for vaccine development: in silico and in vitro screening*", under the supervisors of **Sophie Yvette Leclercq**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 28, 2009**.

This certificate expires in **October 28, 2014**.

Belo Horizonte, 18 de Novembro de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetesa - cetesa@proq.ufmg.br

Mod.Cert. v1.0)