

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

**WALTER RODRIGO POLITANO**

**AVALIAÇÃO DAS AÇÕES BACTERICIDA E OPSONIZANTE  
DA LACTOFERRINA SOBRE *Streptococcus pneumoniae*,  
SOZINHA OU COMBINADA À LISOZIMA.**

Bragança Paulista  
2015

**WALTER RODRIGO POLITANO – R.A. 001201201463**

**AVALIAÇÃO DAS AÇÕES BACTERICIDA E OPSONIZANTE  
DA LACTOFERRINA SOBRE *Streptococcus pneumoniae*,  
SOZINHA OU COMBINADA À LISOZIMA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Biologia celular e molecular.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertocini

Bragança Paulista  
2015

WC 217 Politano, Walter Rodrigo.  
P829a Avaliação das ações bactericida e opsonizante da lactoferrina sobre *Streptococcus pneumoniae*, sozinha ou combinada à lisozima / Walter Rodrigo Politano -- Bragança Paulista, 2015.  
76 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.  
Orientação de: Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini.

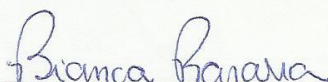
1. *Streptococcus pneumoniae*. 2. Lactoferrina.  
3. Lisozima. I. Bertoncini, Michelle Darrieux Sampaio.  
II. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelas bibliotecárias do Setor de Processamento Técnico da Universidade São Francisco.

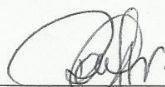
**POLITANO,R.**, Walter, "Avaliação das ações bactericida e opsonizante da lactoferrina sobre *Streptococcus pneumoniae*, sozinha ou combinada à lisozima". Tese defendida e aprovada no programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 16 de dezembro de 2015 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini  
Universidade São Francisco



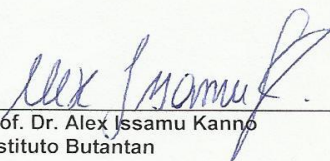
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Bianca Barassa  
Universidade São Francisco



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Raquel de Cassia dos Santos  
Universidade São Francisco



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Thais Manzano Parisotto  
Universidade São Francisco



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alex Issamu Kanno  
Instituto Butantan

A minha família e amigos, que com a paciência dos sábios, cederam preciosas horas de convívio para que este texto pudesse ser escrito.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que, de modo generoso, colocaram à minha disposição os seus conhecimentos e o seu tempo; devo-lhes, ideias e retificações valiosas.

Desde as inquietações iniciais, minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini, acompanhou o desenvolvimento do projeto, e a ela dedico um agradecimento muito especial, por seu estímulo nos momentos de angústia, e pela orientação sensível e serena, que possibilitou a eu percorrer o caminho do aperfeiçoamento e do conhecimento, até chegar a comunhão de um novo pensar.

Um enorme “Obrigado” aos professores Lúcio Fábio Caldas Ferraz, Giovana Tófoli, Alessandra Gambero e a todos que compõem o programa de doutorado. Sem vocês este trabalho não teria acontecido.

Agradeço aos que conciliaram seu escasso tempo e trouxeram elementos enriquecedores para o estudo, em especial, Greiciely André de Oliveira.

Agradeço a todos os meus familiares, que suportaram minha ausência, à companheira e esposa Naflávia, que procurou compreender minhas aflições e o tempo em que me dediquei à minha tese.

A todos meu sincero respeito e reconhecimento. Muito obrigado!

*“Visita o Interior da Terra e,  
Seguindo em Linha reta, em  
Profundidade, Encontrarás a  
Pedra Oculta”.*

∴

## RESUMO

*Streptococcus pneumoniae* é um agente colonizador comum da nasofaringe humana, que, ocasionalmente, pode espalhar-se para outras regiões, provocando doenças tais como a otite média, sinusite, pneumonia, bacteremia e meningite. A lactoferrina (LF) e a lisozima (LZ) são dois componentes importantes do sistema de imunidade da mucosa inata, que exibem efeitos líticos e opsonizante contra uma ampla gama de micro-organismos. A apolactoferrina (ALF) exerce os seus efeitos bactericidas, produzindo peptídeos catiônicos, que interagem com a membrana da célula, causando a lise. A LZ facilita a degradação peptoglicana pela clivagem das ligações entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina, levando à desestabilização da parede celular e da lise. Dado que eles são encontrados em nichos semelhantes ao do hospedeiro, propõe-se que LF e LZ atuam de forma sinérgica no controle da propagação bacteriana em toda a mucosa. Revelou-se que a combinação de LF e LZ aumenta a destruição de diferentes agentes patógenos *in vitro*, com a LF facilitando a ação da LZ. O presente trabalho investigou as ações bactericidas e opsonizante da lactoferrina sobre *S. pneumoniae*, sozinha ou combinada à lisozima. As bactérias de diferentes sorotipos apresentaram uma variação de suscetibilidade restrita à lise por ALF e LZ, enquanto a administração concomitante de ALF e LZ aumentou de modo significativo, a morte dos pneumococos. A influência da cápsula sobre os efeitos líticos de LZ foi estudada através do uso de uma estirpe negativa de cápsula, e verificou-se que essa era mais susceptível à destruição por LZ do que a estirpe do tipo selvagem. O papel da proteína de superfície pneumocócica A (PspA) na prevenção da morte dos pneumococos mediada por LF foi demonstrado através da incubação com fragmentos recombinantes de PspA, e verificou-se ser independente do tipo da família ou clado da PspA. Além disso, a adição de anticorpos anti-PspA foi capaz de aumentar a lise pneumocócica por ALF, independentemente das semelhanças de sequências entre a molécula expressa na superfície bacteriana, PspA recombinante, e aquela utilizada para produzir os anticorpos. A ligação da ALF à superfície pneumocócica foi confirmada por citometria de fluxo e verificou-se ser dependente da presença de cápsula e PspA, uma vez que a interação de LF foi eliminada tanto na cápsula de estirpe negativa mutante quanto na presença de anticorpos anti-PspA. O potencial opsonizante da hololactoferrina (HLF) na presença do complemento ficou evidente na ação combinada favorecendo a fagocitose pelos polimorfonucleares, já no ensaio *in vivo* os resultados sugerem um possível mecanismo de interação de clearance entre anticorpos anti-PspA e ALF contra pneumococos na mucosa, e reforça a PspA como um antígeno alvo da vacina.

**Palavras Chaves:** *Streptococcus pneumoniae*, lactoferrina e lisozima.



## ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae* is a common colonizing agent of the human nasopharynx, which can occasionally spread to other regions, causing diseases such as otitis media, sinusitis, pneumonia, bacteremia and meningitis. Lactoferrin (LF) and lysozyme (LZ) are two important components of innate mucosal immune system, and opsonizing that display lytic effect against a broad range of microorganisms. The apolactoferrina (ALF) exerts its bactericidal effects, producing cationic peptides, which interact with the cell membrane, causing lysis. LZ peptoglicana facilitates the degradation by cleavage of the bonds between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine, leading to destabilization of the cell wall lysis. Since they are found in niches similar to the host, it is proposed that LZ and LF act synergistically in controlling bacterial propagation across the mucosa. It was revealed that the combination of the LF and LZ increases the destruction of different pathogens *in vitro* with LF facilitating LZ action. This study investigated the antibacterial and opsonizing shares of lactoferrin against *S. pneumoniae*, alone or combined lysozyme. The bacteria of different serotypes showed a susceptibility variation restricted to lysis by ALF and LZ, while the concomitant administration of ALF and LZ increased significantly, the death of pneumococci. The influence of the capsule on the LZ lytic effect was studied by using a capsule negative strain, and it was found that it was more susceptible to destruction by LZ than the wild type strain. Role of pneumococcal surface protein A (PspA) in the prevention of death of pneumococci mediated LF was demonstrated by incubation with recombinant PspA fragments, and was found to be independent of the type or family of PspA clade. Furthermore, the addition of anti-PspA antibodies were able to increase the pneumococcal lysis by ALF, regardless of the sequence similarities between the molecule expressed on the bacterial surface of recombinant PspA and that used to produce the antibodies. The binding of alpha pneumococcal surface was confirmed by flow cytometry and found to be dependent on the presence of capsule and PspA, since the interaction of LF was eliminated in both negative mutant strain capsule and in the presence of anti-PspA antibodies. The opsonizing potential hololactoferrina (HLF) in complement presence was evident in the combined action favoring phagocytosis by polymorphonuclear already in the *in vivo* test results suggest a possible clearance interaction mechanism between anti-PspA and ALF pneumococcal antibody in the mucosa, and reinforces the PspA as a vaccine target antigen.

**Key-Words:** *Streptococcus pneumoniae*, lactoferrin and lysozyme.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALF	Apolactoferrina
AS	Solução de Ensaio
BSA	Albumina Bovina Sérica
C3b	Proteína do Sistema Complemento
CDC	Citolisina
CDR	Região Definidora de Clado
ChoP	Fosfocolina
CPS	Cápsula Polissacarídica
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
DPI	Doença Pneumocócica Invasiva
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
HLF	Hololactoferrina
IAL	Instituto Adolpho Lutz
KDa	Quilodáton
KO	Knock-out
LF	Lactoferrina
LFN	Lactoferricina
LtyA	Autolisina
LZ	Lisozima
MIC	Concentração Inibitória Mínima

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	Orto-fenilenediamina
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PdT	Pneumolisina detoxificada com três mutações
pH	Potencial Hidrogênioônico
Ply	Pneumolisina
PMN	Polimorfonucleares
PNI	Programa Nacional de Imunização
PS	Polissacarídeo Capsular
PspA	Proteína A de Superfície Pneumocócica
PspC	Proteína C de Superfície Pneumocócica
THY	Todd Hewitt
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Classificação dos clados e famílias de PspA segundo o grau de identidade.....	21
TABELA 2-	Isolados de pneumococo utilizados neste estudo.....	28
TABELA 3-	Grupos e condições experimentais da avaliação do efeito combinado de Lisozima e ALF.....	30
TABELA 4-	Concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; MIC) e índice de inibição fraccionada das concentrações (FIC) em 8 h.....	43
TABELA 5-	Títulos de Anticorpos em camundongos imunizados com fragmentos de PspA recombinantes.....	44

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Curvas de crescimento dos isolados de pneumococo St 245/00, A66.1, D39, 679/99 e 3JYP2670.....	37
FIGURA 2-	Suscetibilidade dos isolados de <i>Streptococcus pneumoniae</i> à ação bactericida de apolactoferrina.....	38
FIGURA 3-	A suscetibilidade das estirpes de <i>Streptococcus pneumoniae</i> à ação bactericida da lisozima.....	40
FIGURA 4-	Efeito combinado da ALF e LZ sobre o <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	42
FIGURA 5-	Influência de anticorpos anti-PspA na morte pneumocócica por ALF.....	45
FIGURA 6-	Influência de anticorpos anti-PspA na morte pneumocócica.....	46
FIGURA 7-	A inibição do efeito bactericida da ALF por fragmentos de PspA recombinantes.....	47
FIGURA 8-	Ligação HLF aos pneumococos é inibida na presença de anticorpos anti-PspA.....	49
FIGURA 9-	Ação opsonizante da HLF e C3b sobre a fagocitose de <i>S pneumoniae</i> D39 e RM200.....	50
FIGURA 10-	Influência de anticorpos anti-PspA na Clearance pneumocócica por ALF na mucosa nasal de camundongos.....	51
FIGURA 11-	Influência de anticorpos anti-PspA na clearance pneumocócica por ALF nos lavados nasais da mucosa de camundongos.....	51

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	17
1.2 Fatores de virulência .....	19
1.3 PspA como candidato vacinal contra <i>S. pneumoniae</i> .....	21
1.4 Lactoferrina, lisozima e PspA. ....	23
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	26
2.1 objetivos específicos .....	26
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	27
3.1 Aspectos éticos.....	27
3.1.1 Comitê de Ética em Pesquisa – CEP .....	27
3.1.2 Comitê de Ética em Pesquisa Animal .....	27
3.2 Estabelecimento das curvas de crescimento de diferentes isolados de pneumococo..	27
3.3 Avaliação do efeito bactericida da lactoferrina sobre <i>S. pneumoniae</i> St 245/00, A66.1, D39, RM200, 679/99 e 3JYP2670. ....	28
3.4 Avaliação do efeito bactericida da lisozima sobre isolados de <i>S. pneumoniae</i> .....	29
3.5 Avaliação do efeito combinado da lactoferrina e lisozima sobre isolados de pneumococo .....	30
3.6 Imunização de camundongos BALB/c com PspAs recombinantes. ....	31
3.7 Efeito cruzado dos anticorpos anti-PspA na morte pneumocócica por ALF.....	32
3.8 Dosagem dos anticorpos anti-PspA no soro de camundongos imunizados. ....	32
3.9 Inibição da atividade bactericida de ALF por PspAs recombinantes .....	33
3.10 Análise da interação entre a Lactoferrina e <i>S. pneumoniae</i> .....	33
3.11 Avaliação do potencial opsonizante da lactoferrina sobre a fagocitose de <i>S. pneumoniae</i> in vitro.....	34
3.11.1 Isolamento de Leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico humano .....	34
3.11.2 Ensaio de opsonofagocitose de pneumococos por leucócitos polimorfonucleares in vitro. ....	34
3.12 Efeito da lactoferrina sobre a clearance de <i>S. pneumoniae</i> na mucosa nasal de camundongos .....	35
3.13 Análise estatística.....	36

<b>4. RESULTADOS</b> .....	37
4.1 Curvas de crescimento dos isolados de pneumococo .....	37
4.2 Avaliação do efeito bactericida da ALF sobre <i>S. pneumoniae</i> .....	37
4.3 Avaliação dos efeitos bactericidas da lisozima sobre <i>S. pneumoniae</i> .....	39
4.4 Avaliação dos efeitos combinados da Lactoferrina e Lisozima sobre <i>S. pneumoniae</i> .....	41
4.5 Efeito cruzado dos anticorpos anti-PspA sobre a ação bacteriana de ALF.....	43
4.5.1 Dosagem de anticorpos anti-PspA em soro de camundongos imunizados .....	43
4.6 A inibição da atividade de ALF por PspAs.....	47
4.7 A ligação da Lactoferrina ao <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	48
4.8 Avaliação do efeito opsonizante da lactoferrina sobre a fagocitose de <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	50
4.9 Efeito da Lactoferrina sobre o clearance de <i>Streptococcus pneumoniae</i> na mucosa nasal de camundongos.....	50
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	59
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60
<b>ANEXOS</b> .....	72

## 1 INTRODUÇÃO

*Streptococcus pneumoniae* é um colonizador comum da nasofaringe de crianças e adultos saudáveis, podendo sob certas circunstâncias, espalhar-se para outros locais, tais como os pulmões, meninges e sangue, provocando reações inflamatórias intensas e levando a doenças como a pneumonia, meningite e septicemia (KADIOGLU et al., 2008). Sua incidência e mortalidade são maiores entre os idosos e crianças; a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 1,6 milhões de pessoas morrem todo o ano no mundo devido a doenças pneumocócicas, sendo que destas, em torno de 1 milhão são crianças com menos de 5 anos, e que a maioria dos casos ocorre em países em desenvolvimento (OMS, 2007).

Os mecanismos iniciais de resistência às infecções por pneumococo incluem barreiras físicas como o muco, que limita a adesão da bactéria ao epitélio respiratório, e a presença de determinados compostos como lactoferrina e lisozima que são duas proteínas antimicrobianas essenciais do sistema imune inato de mucosa (PARKER e PRINCE, 2011).

A lisozima, também conhecida como muramidase, é o polipeptídeo mais abundante nas secreções do trato respiratório ( $> 500 \mu\text{g/mL}$ ) (COLE et al., 2002); está presente na lágrima, saliva, pele, urina, muco, leite e colostro, além dos grânulos primários e secundários dos neutrófilos e nos fagócitos mononucleares (GANZ, 2002). Sua principal ação é a hidrólise de componentes da parede celular bacteriana. A ação da lisozima envolve a quebra das ligações  $\beta$  1-4 glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, presentes no peptidoglicano da parede celular das bactérias Gram positivas; a desestruturação do arcabouço da parede pode levar à lise da bactéria devida à grande diferença de pressão osmótica ao longo da membrana citoplasmática (JOLLES, 1964; SINNOTT, 1993; GANZ, 2002; MARANA et al., 2006). Outra ação da lisozima é a atividade de quitinase, que quebra a ligação glicosídica da quitina presente na parede dos fungos (JOLLES, 1984).

Foi demonstrado que citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- $\alpha$ , são capazes de elevar os níveis da lisozima e estimular o *Burst* respiratório, fazendo com que esta proteína seja detectada em concentrações elevadas nos locais de inflamação (GANZ, 2002). Além da atividade antimicrobiana, a lisozima humana aumenta a atividade fagocítica de polimorfonucleares e macrófagos e estimula a proliferação de monócitos (NIYONSABA & OGAWA, 2005).

Lactoferrina (LF), é uma glicoproteína de ~80 kilo Daltons, composta por uma cadeia polipeptídica simples dobrada em dois lobos simétricos (N e C) altamente homólogos. Cada



lobo contém um sítio de ligação de ferro. Na sua forma livre de Ferro (apolactoferrina – ALF), os sítios de ligação de ferro estão livres, enquanto na forma hololactoferrina (HLF), os sítios são preenchidos por um íon de ferro por lobo, geralmente  $Fe^{3+}$  (BAKER et al., 2000).

A Lactoferrina é um membro da família das transferrinas e está presente na maioria das secreções biológicas e nos neutrófilos. Possui diversas funções biológicas importantes, incluindo atividade antibacteriana para um amplo espectro de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Normalmente, a sua concentração é relativamente baixa no soro e no meio extracelular. No entanto, durante processos inflamatórios, como doenças neurodegenerativas, inflamação intestinal, artrite e inflamação alérgica, as concentrações de LF aumentam consideravelmente (UCHIDA, MATSUSE et al., 1994; GALLI, TSAI et al., 2008).

LF é produzida por células epiteliais da mucosa em diversas espécies de mamíferos, sendo encontrada na lágrima, saliva, fluidos vaginais, sêmen (BAKER e BAKER., 2009), secreções nasais e brônquicas, bile, líquido gastrointestinal, urina e em maior concentração no leite e no colostro, tornando-se a segunda proteína mais abundante no leite (GONZALEZ-CHAVEZ, AREVALO-GALLEGOS et al., 2009). Também está presente nos fluidos corporais, como no plasma sanguíneo e líquido amniótico, e em quantidades consideráveis nos grânulos de neutrófilos (BAKER e BAKER, 2009).

A sua distribuição em vários tecidos faz da lactoferrina uma proteína multifuncional, cujas propriedades incluem a regulação da absorção do ferro no intestino; a modulação da resposta imune; ação antioxidante, anticarcinogênica e propriedades anti-inflamatórias; proteção contra infecções microbianas (LEGRAND et al., 2005; GONZALEZ-CHAVEZ, AREVALO-GALLEGOS et al., 2009; ACTOR et al., 2009).

A atividade antimicrobiana da LF consiste, em grande parte, de dois mecanismos. O primeiro é o sequestro de ferro em locais da infecção, que priva o microrganismo deste nutriente, criando um efeito bacteriostático (JENSSEN e HANCOCK, 2009). O segundo é a interação direta da molécula da LF com o agente infeccioso. O lobo N da LF contém elevadas concentrações de peptídeos carregados positivamente, conhecidos como lactoferrinas, que permitem a interação com moléculas aniônicas da membrana citoplasmática das bactérias, resultando em uma desestabilização da membrana e, conseqüente, lise celular (GIFFORD et al., 2005). LF também apresenta ação opsonizante, facilitando a fagocitose de bactérias *in vitro*.

Além de suas propriedades antimicrobianas, a LF tem capacidade de modular a resposta imune global e de proteger contra infecções virais e choque séptico. Embora os

mecanismos moleculares e celulares dos efeitos imunomoduladores da LF não sejam totalmente elucidados, estudos sugerem a existência de vários mecanismos que incluem a modulação da produção de quimiocinas, citocinas e espécies reativas de oxigênio (WARD, URIBE-LUNA et al., 2002; VALENTI e ANTONINI, 2005). LF também pode favorecer a ativação, diferenciação e proliferação das células imunes, através do reconhecimento de receptores específicos (BAKER 2005; BAKER e BAKER 2005; LEGRAND, ELASS et al., 2006).

### **1.1 *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* é um diplococo gram-positivo encapsulado,  $\alpha$ -hemolítico e catalase-negativo (MARRIOTT e DOCKRELL, 2006). É uma bactéria extracelular, capaz de se replicar na circulação, nos tecidos conjuntivos e em espaços teciduais, tais como os lumens das vias aéreas.

A superfície do pneumococo é constituída de três estruturas: a membrana plasmática, que exibe uma estrutura conservada, com moléculas de ácido lipoteicóico – contendo resíduos de fosfocolina (ChoP); a parede celular composta de polissacarídeos e ácido teicóico, que ancora diversas proteínas de superfície; e a cápsula polissacarídica, que possui entre 200-400 nm de espessura (DAWSON, 2004; KADIOGLU et al., 2008) e apresenta estrutura química bastante diversa.

A estrutura química variável do polissacarídeo capsular permite até o momento a sua classificação em 93 sorotipos (BRAIDO et al., 2008; PLETZ et al., 2008; MALLEY, 2009). Destes, um pequeno número predomina como agentes causadores de doença no homem; estima-se que 11 sorotipos sejam responsáveis por 75% das infecções pneumocócicas em todo o mundo, sendo que a maioria das bactérias apenas causa a colonização sem invasão (DAWSON, 2004).

Estudos epidemiológicos demonstraram que no Brasil, entre 1977-2000, os sorotipos mais frequentes foram: 1, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F, sendo que 76,5% das cepas foram isoladas em crianças menores de 5 anos de idade com meningite (BRANDILEONE, 2003; YOSHIOKA et al., 2011).

Uma vacina contendo polissacarídeos, de 14 sorotipos foi produzida e licenciada nos EUA em 1977, tendo sido posteriormente substituída por uma formulação 23-valente, utilizada até os dias atuais na imunização de adultos. Em 2000, foi lançada a primeira vacina

anti-pneumocócica conjugada, contendo polissacarídeo capsular (PS) de 7 sorotipos prevalentes fusionados ao toxóide diftérico. A partir de março de 2010, formulações contendo 10 polissacarídeos passaram a fazer parte do Calendário Básico de Vacinação do Programa Nacional de Imunização (PNI) (Ministério da Saúde, 2010 – C, D). Outra vacina contém 13 sorotipos conjugadas à proteína diftérica CRM-197. Estima-se que os três sorotipos adicionais aos 10 incluídos na vacina 10 valente, (3, 6A e 19A) aumentem para 92% a cobertura da vacina para prevenção de Doença Pneumocócica Invasiva (DPI) em lactentes e crianças menores de 5 anos no mundo todo. No Brasil, essa vacina representaria a possibilidade de prevenção de 87% dos casos de DPI em crianças com menos de 5 anos de idade.

O estudo de Hirose et al. (2014) comparou o período pré-vacinal com o pós-vacinal da vacina 10 valente, houve uma redução de 54% de casos de meningite em menores de 1 ano, o percentual de sorotipos incluídos na vacina conjugada reduziu de 75,9 para 46,7% e considerando a faixa etária 12 a 23 meses, a redução foi maior de 73,9 para 20%, já na faixa abaixo de 2 anos houve uma redução de 80,7 para 53,3%. Afonso et al. (2013) encontrou uma redução significativa na hospitalizações por pneumococos em Belo Horizonte, Curitiba e Recife, mas o impacto do uso da vacina e seus benefícios na redução da colonização nasofaríngea e transmissão de sorotipos vacinais por crianças vacinadas, são muito precoces para fase de análise.

O descobrimento da penicilina, utilizada na prática clínica a partir de 1943, mudou a história natural da doença pneumocócica. No entanto, a resistência a essa droga passou a ser relatada na literatura a partir de 1967, constituindo-se, especialmente a partir dos anos 90, em grave problema de saúde pública (CROOK e SPRATT, 1998; TAVARES, 2001; LOW, 2005).

O número de cepas de pneumococo resistentes a antibióticos tem aumentado de forma alarmante nas últimas décadas. A resistência à penicilina G é devida a uma alteração das proteínas de ligação da penicilina. A resistência dos pneumococos à penicilina tende ser clonal. Os pneumococos também são frequentemente resistentes à combinação de sulfametoxazol com trimetoprima bem como, algumas vezes, à eritromicina e tetraciclina (BRANDILEONE et al., 2006; LUNDSTROM et al., 2004), reforçando a necessidade de se ampliar as estratégias de prevenção destas doenças.

Estas elevadas taxas de mortalidade e morbidade das infecções pneumocócicas, aliadas ao surgimento e à disseminação de cepas resistentes aos antibióticos e às perdas econômicas e sociais, fazem com que as pesquisas sobre novas vacinas para prevenção das infecções por *S.*

*pneumoniae* sejam atualmente, consideradas uma prioridade no mundo todo (CDC, 2007; BRAIDO et al., 2008).

O pneumococo coloniza o trato respiratório superior dos seres humanos e pode ser isolado da nasofaringe de até um quarto dos adultos saudáveis e 80% das crianças menores de cinco anos de idade (AUSTRIAN, 1989), estudos realizados em algumas regiões do Brasil demonstraram taxas de colonização em torno 13,9 a 72%, com destaque para as crianças que frequentam as creches (LAVAL et al., 2006; CARDOZO et al., 2008; REIS et al., 2008; FRANCO et al., 2010). Entretanto, a distribuição dos sorotipos apresentam variações influenciadas por diversos fatores, como, região geográfica, grupos etários e condições socioeconômicas dos indivíduos (OBARO e ADEGBOLA, 2002; BOGAERT et al., 2004). Nos países industrializados predominam os sorotipos 19F, 6B, 6A, 14, 18C e 23F (SYROGIANNOPOULOS et al., 2000; BOGAERT et al., 2001; SYRJANEN et al., 2001; COLES et al., 2009), já nos países em desenvolvimento é adicionado os sorotipos 15, 33, 12 e 3, e na América Latina tem uma maior frequência das cepas 14, 6A, 6B, 19F e 23F (GOMEZ et al., 2002; LAVAL et al., 2006; PARASKAKIS et al., 2006; BEREZIN et al., 2007; OZDEMIR et al., 2008)

A doença pneumocócica é sempre precedida pela colonização decorrente da invasão de sítios estéreis pelas bactérias. A pneumonia resulta da aspiração de bactérias da nasofaringe para os pulmões, seguida por intensa reação inflamatória local, que pode ser fatal. A sepse se desenvolve em cerca de 10-15% dos casos de pneumonia pneumocócica. Por volta de cinco milhões de crianças com idade inferior a cinco anos morrem anualmente por pneumonia pneumocócica (HAUSDORFF et al., 2000; GARCIA et al., 2006). Os componentes da superfície bacteriana desempenham um importante papel no início da infecção, por inibirem o sistema complemento e a fagocitose, principalmente pelos neutrófilos (BALTIMORE e SHAPIRO, 1991; WATSON et al., 1995).

## **1.2 Fatores de virulência**

A virulência do pneumococo está associada a duas características importantes: sua capacidade de resistir à fagocitose pelo sistema imune do hospedeiro e a capacidade de colonizá-lo (ROSENOW et al., 1997; BOSARGE et al., 2001; THORNTON e MCDANIEL, 2005).

A cápsula polissacarídica (CPS) é considerada essencial na resistência ao sistema complemento, e a interação de pneumococos com o complemento varia de acordo com o tipo de cápsula (MCDANIEL e SWIATLO, 2004; KERR et al., 2006).

Abaixo da cápsula encontra-se a parede celular rica em ácido teicóico; esta molécula, também conhecida como polissacarídeo C, contém resíduos de colina que são responsáveis pela resposta inflamatória intensa observada na infecção por pneumococo, com ativação do sistema complemento e produção de citocinas (DAWSON, 2004).

Além da cápsula, diversas proteínas desempenham papel importante na adesão e na doença invasiva (WATSON et al., 1995; MITCHELL e ANDREW, 1997).

A pneumolisina (Ply) é uma enzima citoplasmática produzida por todos os isolados clínicos de *S. pneumoniae*, que apresenta múltiplas funções: ativa o sistema complemento, estimula a apoptose das células do hospedeiro, atua como citolisina (CDC), ligando-se ao colesterol da membrana plasmática do hospedeiro e formando poros (PRICE e CAMILLI, 2009).

A autolisina é uma enzima responsável pela degradação do peptidoglicano de parede celular levando à lise das células bacterianas. A amidase LtyA é uma enzima pertencente ao grupo das autolisinas, que atua direta e indiretamente na patogênese da infecção pneumocócica. O aumento desse componente de parede celular induz intensa atividade inflamatória (TUOMANEN, 1999).

A proteína A de superfície pneumocócica (PspA) é um fator de virulência exposto, sorologicamente variável e presente em todos os isolados de pneumococos, com uma massa molecular que pode variar entre 67 e 99 KDa (BRILES et al., 2000b). PspA atua como inibidor da ativação de complemento mediada por fator B *in vivo* (via alternativa) e como inibidor da deposição de C3b e seu processamento (degradação das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ ) *in vitro* (REN et al., 2004a).

PspA é capaz de prevenir a morte do pneumococo ao ligar-se à lactoferrina, (REN et al., 2004; SHAPER et al., 2004). A PspA adquire um potencial de carga positiva, que possibilita uma interação com a lactoferrina nos sítios de ligação, que são presumivelmente de potencial negativo, por interagirem com os íons  $Fe^{2+}$  ou  $Fe^{3+}$  (KOLBERG et al., 2003). Foi demonstrado que a presença de anticorpos anti-PspA aumenta os feitos bactericidas da ALF, possivelmente por bloquear os sítios de interação da PspA com LF, corroborando esses resultados, a adição de PspAs recombinantes reduz a ação bactericida da LF sobre *S.*

*pneumoniae*, por competir com a proteína da bactéria pela ligação com LF (SHAPER et al., 2004).

### 1.3 PspA como candidato vacinal contra *S. pneumoniae*.

A proteína A de superfície pneumocócica é um fator de virulência exposto, composta por quatro domínios distintos: uma região N-terminal rica em  $\alpha$ -hélices e altamente carregada, que compreende a porção funcional da PspA e projeta-se para fora da cápsula; uma região rica em resíduos de prolina; uma região de ligação à colina, responsável pela fixação da proteína à superfície da bactéria e uma cauda C-terminal hidrofóbica curta (GOR et al., 2005; JEDRZEJAS et al., 2001; BRILES et al., 2000b).

A região N-terminal foi subdividida nas porções A, A' e B, através de estudos de alinhamento de sequências de PspAs distintas. Dentre estas, a região B, também conhecida como “região definidora de clado” (CDR), apresentou padrão de variação mais previsível, servindo como base para a classificação de PspA em 3 famílias, subdivididas em 6 clados, de acordo com o grau de identidade, conforme mostrado na Tabela 1. Esta região contém a maior parte dos epitopos imunogênicos (MCDANIEL et al., 2004) e é capaz de proteger camundongos contra o desafio invasivo com pneumococos virulentos (TAI, 2006). A carga negativa na extremidade N-terminal está implicada na redução de deposição da proteína de complemento C3b na superfície bacteriana, resultando na inibição de opsonofagocitose da bactéria, mediada pela via alternativa do complemento (REN et al., 2004b; JARVA et al., 2003; TU et al., 1999).

**TABELA 1-** Classificação dos clados e famílias de PspA segundo o grau de identidade (adaptado de HOLLINGSHEAD et al., 2000).

Família 1		Família 2			Família 3
Clado 1	Clado 2	Clado 3	Clado 4	Clado 5	Clado 6

As PspAs podem ser consideradas de uma mesma família quando a semelhança da região definidora de clado é superior à 45%, moléculas de um mesmo clado apresentam semelhança superior à 80% (HOLLINGSHEAD et al., 2000). As PspAs de famílias 1 e 2, especialmente os clados 1 a 4, são predominantes em todo o mundo (VELA et al., 2001; MOLLERACH et al., 2004; BEALL et al., 2000) e no Brasil, estão presentes em 99% dos isolados clínicos (BRANDILEONE et al., 2004; PIMENTA et al., 2006).

A principal função de PspA está relacionada à sua capacidade de inibir a deposição de proteínas do complemento na superfície bacteriana, uma característica observada nas moléculas de famílias 1 e 2 (REN et al., 2003). Estudos utilizando pneumococos PspA negativos demonstraram que esta proteína é importante para a virulência da bactéria, e que a virulência está relacionada à capacidade de interagir com o sistema complemento; enquanto os mutantes PspA-negativos são avirulentos em camundongos selvagens, sua virulência é retomada em animais *knock-out* (KO) deficientes nos componentes iniciais da cascata do complemento (REN et al., 2004a).

PspA tem se mostrado imunogênica e protetora em diversos modelos animais (TAI, 2006). Apesar da variação significativa em sua estrutura, a imunização com a porção N-terminal de PspA, das diferentes famílias e clados é capaz de induzir anticorpos com reatividade cruzada (BRILES et al., 2000a; TART et al., 1996; NABORS et al., 2000).

O grau de reatividade cruzada entre PspAs é variável (NABORS et al., 2000). Foi demonstrado que moléculas de PspAs de famílias diferentes induzem anticorpos com capacidades distintas de reconhecimento de moléculas heterólogas (DARRIEUX et al., 2008; MORENO et al., 2010). A variabilidade no reconhecimento também está presente em proteínas do mesmo clado. Um estudo de variabilidade entre PspAs de família 1 identificou dois fragmentos recombinantes, PspA245 e PspA94, capazes de induzir anticorpos com ampla reatividade cruzada dentro desta família (GOULART et al., 2011). No entanto, estas moléculas não foram capazes induzir anticorpos que reconhecessem PspAs de família 2, sugerindo que uma vacina mais abrangente necessitaria conter PspAs de ambas famílias.

Adultos naturalmente infectados ou colonizados com *S. pneumoniae* produzem anticorpos anti-PspA que podem ser detectados no soro e nas secreções de mucosa (BRILES et al., 2004). Estes dados demonstram que PspA é expressa durante o curso da infecção e é facilmente acessível ao sistema imune (SWIATLO e WARE, 2003). Além de seu potencial protetor comprovado em modelos animais, PspA já foi utilizada com sucesso em um ensaio clínico de fase I (BRILES et al., 2000c).

Diferentes estudos sugerem que o papel protetor de PspA, enquanto candidato vacinal, envolve o bloqueio da inibição sobre o sistema complemento (YUSTE et al., 2005); assim, a imunização com PspA resulta na produção de anticorpos capazes de ativar a via clássica, através da porção Fc, e a via alternativa, pela inativação das funções de PspA, levando a um aumento na deposição de C3 na bactéria e “clearance” pelo sistema imune (REN et al.; 2004b, DARRIEUX et al., 2008; GOULART et al., 2011).

#### 1.4 Lactoferrina, lisozima e PspA.

*S. pneumoniae* é capaz de interagir com a lactoferrina humana, e o receptor bacteriano responsável por essa ligação é a PspA (HAMMERSCHMIDT et al., 1999). A PspA tem uma interação maior com a lactoferrina humana do que com a lactoferrina bovina, sugerindo que a ligação possa de alguma forma beneficiar o pneumococo (HAKANSSON, ROCHE et al., 2001).

Inicialmente acreditava-se que o pneumococo utilizaria HLF como fonte de ferro; estudos posteriores, porém, demonstraram que esta bactéria não consegue sequestrar o ferro ligado à HLF (TAI, LEE et al., 1993). Foi proposto então que PspA atuaria sobre a ação bactericida direta de ALF, o que ficou comprovado pela observação, de que pneumococos PspA negativos são mais sensíveis à morte por ALF que aqueles contendo PspA (HAKANSSON, ROCHE et al., 2001). Hakansson, (2001) demonstrou que o domínio da ligação à ALF em PspA está localizado na região de  $\alpha$ -hélice, e corresponde aos aminoácidos 168-288 da molécula de PspA da cepa Rx1 (HAKANSSON, ROCHE et al., 2001).

Estudos posteriores identificaram um peptídeo de 11 aminoácidos localizado no final da região  $\beta$  – peptídeo SM-1 – presente em todos os clados de PspA e responsável pela ligação à ALF (MIRZA, HOLLINGSHEAD et al., 2004).

A estrutura cristalizada de um complexo formado pelo domínio de ligação à ALF de PspA (correspondente aos aminoácidos 168-288 de Rx1) e o lóbulo N da ALF revelou a presença de interações específicas entre a superfície negativa das hélices de PspA e o peptídeo catiônico lactoferrina (LFN), presente no lobo N (SENKOVICH, COOK et al., 2007). A capacidade de PspA em reconhecer LFN ligada à lactoferrina sugere que esta proteína pneumocócica previne o acesso de proteases que fariam a clivagem do lóbulo N, inibindo a liberação do peptídeo bactericida LFN.

Como PspA também é capaz de reconhecer LFN livre, pode-se inferir que mesmo após a proteólise da ALF e liberação de LFN, PspA ainda é capaz de prevenir a morte de pneumococos, bloqueando o acesso deste peptídeo à membrana plasmática da bactéria (SENKOVICH, COOK et al., 2007).

A presença de anticorpos anti-PspA potencializa o efeito bactericida da ALF sobre *S. pneumoniae* (MIRZA, HOLLINGSHEAD et al., 2004); dessa forma, a imunização com PspA poderia induzir proteção não apenas contra doença invasiva, mas também contra a



colonização, através da ativação dos mecanismos de “clearance” mediados por ALF. Recentemente, foi demonstrado que a ação bactericida de ALF sobre *S. pneumoniae* depende da participação de proteases da superfície bacteriana, que promovem a proteólise de ALF e liberação dos peptídeos com ação lítica (MIRZA, WILSON et al., 2011).

Vários estudos indicam que a lactoferrina e lisozima podem atuar em sinergismo. A combinação das duas proteínas induziu um aumento na morte de muitos organismos (ELLISON et al., 1991; LEITCH et al., 1998). Em bactérias Gram-negativas, sugeriu-se que a alteração da permeabilidade da membrana externa provocada pela ação da lactoferrina facilita o acesso de lisozima à parede celular (peptidoglicano) (ELLISON et al., 1991). É observada também uma ação sinérgica semelhante em *Staphylococcus epidermidis*; a ligação de LF ao ácido lipoteicóico na membrana externa bacteriana leva a uma diminuição da carga negativa na superfície, facilitando assim o acesso da lisozima aos peptidoglicanos subjacentes (LEITCH e WILLCOX, 1999).

Uma vez que a lisozima é uma proteína presente em grandes quantidades nas mucosas, este estudo também avaliou os efeitos líticos desta molécula em pneumococos, bem como a contribuição da cápsula polissacarídica na prevenção da morte bacteriana. Os efeitos combinados da lactoferrina e lisozima na morte dos pneumococos também foram examinados, e os resultados fornecem uma visão sobre as interações de pneumococos com o sistema imunológico durante os estágios iniciais da infecção.

A lactoferrina é capaz de inibir a via clássica do complemento, evitando a formação de C3/C5 convertase, possivelmente através de interações com o fator C2. Este efeito inibitório é dose-dependente e é revertido pela adição de íons de Fe<sup>3+</sup> (KIJLSTRA AND JEURISSEN, 1982; VEERHUIS AND KIJLSTRA, 1982).

Os resultados de inibição do complemento, no entanto, são conflitantes; há estudos que relatam a ativação do complemento pela ligação da lactoferrina a superfícies bacterianas (RAINARD, 1993). Os efeitos moduladores da lactoferrina podem, portanto, depender da superfície da bactéria, da forma como interage e do ambiente onde ocorre a ativação (RAINARD, 1993).

O principal mecanismo de clearance de *S. pneumoniae* é a fagocitose mediada por anticorpos, na presença de proteínas do sistema complemento. Foi demonstrado que a lactoferrina é capaz de aumentar a fagocitose de *S. aureus* por fagócitos de glândula mamária de vacas, na presença de fonte de complemento (KAI, KOMINE et al., 2002). No entanto, os efeitos da lactoferrina sobre a fagocitose de pneumococos não foram estudados. Deste modo,

entender a compreensão sobre as ações bactericidas e opsonizantes ou efeito da lactoferrina sobre *Streptococcus pneumoniae* se fez necessário com base na sua relevância clínica.

## 2 OBJETIVO GERAL

- Investigar as ações bactericida e opsonizante da lactoferrina sobre *S. pneumoniae*, sozinha ou combinada à lisozima.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o grau de susceptibilidade de pneumococos de diferentes sorotipos e PspAs à ação da ALF *in vitro*;
- Estudar o papel dos anticorpos anti-PspA na ação bactericida de ALF sobre diferentes isolados *S. pneumoniae*;
- Verificar a sensibilidade de pneumococos de diferentes sorotipos à ação bactericida da Lisozima;
- Avaliar o efeito combinado de lactoferrina e lisozima sobre *S. pneumoniae*;
- Aferir a influência da lactoferrina sobre a fagocitose de pneumococos por leucócitos polimorfonucleares humanos *in vitro*, sozinha ou na presença de uma fonte de complemento;
- Investigar a ligação da lactoferrina à PspA presente na superfície de pneumococos por citometria de fluxo;
- Verificar o efeito da pré-opsonização de pneumococos com lactoferrina e anticorpos anti-PspA no clearance bacteriano nas mucosas nasais de camundongos.

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 Aspectos éticos**

#### **3.1.1 Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade São Francisco (Anexo I). Dez participantes voluntários saudáveis foram orientados sobre toda a pesquisa, receberam o Termo de Consentimento, Livre e Esclarecido, onde após terem feito a leitura, e concordar, assinaram o termo para participar deste estudo. Com o consentimento, os voluntários foram submetidos à coleta de 20 mL de sangue periférico em tubo estéril contendo heparina (10 U/mL).

#### **3.1.2 Comitê de Ética em Pesquisa Animal**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade São Francisco (Anexo II). Foram utilizados 40 camundongos BALB/C, com idade entre cinco e sete semanas, provenientes do Centro de Bioterismo – CEMIB/UNICAMP e FMUSP. Os animais foram alojados no biotério da Universidade São Francisco e permaneceram por um período de adaptação de no mínimo cinco dias até o início dos experimentos. Durante os experimentos, os animais tiveram livre acesso à água e alimento e permaneceram com um ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas em um número máxima de 5 animais por caixa.

### **3.2 Estabelecimento das curvas de crescimento de diferentes isolados de pneumococo.**

Estoques de pneumococos congelados de diferentes sorotipos (tabela 2) foram descongelados, plaqueados em ágar sangue (Neoprov) e incubados a 37 °C em condições anaeróbias, durante 16 horas. Com o auxílio de um swab, as colônias foram transferidas da placa para um tubo com 5 mL de meio THY (meio Todd Hewitt suplementado com 0,5% de extrato de levedura), e diluídas até a  $DO_{600nm}$  inicial em torno de 0,1. As amostras foram cultivadas até a  $DO_{600nm} = 0.4-0.5$ , seguida de nova diluição, onde alíquotas de 100  $\mu$ L da suspensão bacteriana foram acrescidas em um novo tubo contendo 5 mL de THY e

cultivadas até a  $DO_{600nm} = 0.1-0.2$  (correspondendo a aproximadamente  $10^7$  UFC /mL ). Durante o período de cultivo foram realizadas medidas de densidade óptica em intervalos de uma hora. Este protocolo foi descrito por Shaper et al., (2004), conforme é necessário para limitar a quantidade de cápsula depositada na superfície da bactéria, permitindo uma melhor exposição da PspA, se aproximando da morfologia da bactéria durante a colonização (BRILES et al., 2005).

**TABELA 2** - Isolados de pneumococo utilizados neste estudo.

Estirpe	PspA clado	Família PspA	Tipo de Cápsula	Fonte
245/00 <sup>c</sup>	1	1	14	Instituto Adolpho Lutz
94/01 <sup>c</sup>	2	1	18 <sup>a</sup>	Instituto Adolpho Lutz
A66.1 <sup>b</sup>	2	1	3	Univ.do Alabama em Birmingham
D39 <sup>b</sup>	2	1	2	Univ.do Alabama em Birmingham
RM200 <sup>a</sup>	2	1	-	Univ.do Alabama em Birmingham
679/99 <sup>c</sup>	3	2	6B	Instituto Adolpho Lutz
St0603 <sup>b</sup>	3	2	6B	Univ.do Alabama em Birmingham
259/98 <sup>c</sup>	3	2	14	Instituto Adolpho Lutz
3JYP 2670 <sup>b</sup>	4	2	3	Univ.do Alabama em Birmingham
P101 <sup>c</sup>	4	2	19F	Univ.do Alabama em Birmingham

<sup>a</sup> Estirpe não-encapsulada, autolisina negativa, com o gene da ply substituído por pdT. Gentilmente cedidas pelo Dr. Richard Malley (Children's Hospital).

<sup>b</sup> Gentilmente cedidas pelo Dr. David Briles (UAB).

<sup>c</sup> P101 é um isolado clínico do Instituto Adolpho Lutz (IAL), São Paulo Brasil.

### 3.3 Avaliação do efeito bactericida da lactoferrina sobre *S. pneumoniae* St 245/00, A66.1, D39, RM200, 679/99 e 3JYP2670.

O efeito bactericida da apolactoferrina (ALF) sobre *S. pneumoniae* foi avaliado utilizando o protocolo descrito por Shaper et al., (2004). Pneumococos descritos na tabela 2 foram cultivados e rediluídos em THY até  $DO_{600nm} = 0.1- 0.2$  conforme o item 3.2. Em seguida, alíquotas de 1 mL de suspensão bacteriana foram centrifugadas (3000 x g) de 6 a 10 minutos (dependendo do isolado) e em seguida lavadas com 1 mL de tampão fosfato salina (PBS), seguido por uma nova centrifugação.

Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de solução de ensaio (AS) contendo 50  $\mu\text{M}$  de cloreto de cálcio  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM de cloreto de sódio  $\text{NaCl}$ , 1 mM de cloreto de magnésio  $\text{MgCl}_2$  e 1 mM de fosfato de potássio hidrogênio  $\text{K}_2\text{PO}_4$ . Alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana foram incubadas durante uma hora a 37 °C na presença de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ALF (Sigma) (correspondente 3.1 e 6.2  $\mu\text{M}$  ALF, respectivamente), utilizando tampão de ALF para completar o volume de 400  $\mu\text{L}$  totais. Em seguida, foram realizadas seis diluições seriadas das amostras, plaqueadas em ágar sangue. As placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C, em anaerobiose para contagem das colônias bacterianas sobreviventes ao tratamento. A contagem foi feita a partir da menor diluição contável, e foram calculadas as médias geométricas de cada amostra. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos para confirmação dos resultados.

### **3.4 Avaliação do efeito bactericida da lisozima sobre isolados de *S. pneumoniae*.**

A ação lítica da lisozima sobre *Streptococcus pneumoniae* foi avaliada utilizando-se uma versão modificada do protocolo descrito por Lee et al. (2004). Isolados de pneumococo 245/00, A66.1, D39 e 679/99 e a estirpe mutante RM200 (uma bactéria negativa para cápsula e autolisina derivada de D39, gentilmente cedida pelo Doutores Richard Malley (do Hospital Infantil e Escola de Medicina de Harvard) e David Briles do Departamento de Microbiologia (UAB), foram cultivados conforme o item 3.2; 1 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada (3000 x g) durante 6 a 10 minutos (dependendo do isolado) e lavadas com 1 mL de solução tampão fosfato salina (PBS), seguida de uma nova centrifugação. Os pellets foram ressuspensos em 1 mL do mesmo tampão utilizado para ALF contendo 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$ , 150 mM de  $\text{NaCl}$ , 1 mM de  $\text{MgCl}$  e 1 mM de  $\text{K}_2\text{PO}_4$ . Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana foi incubada durante uma hora a 37 °C na presença de 12,5 mg/mL e 25 mg/mL (correspondendo a 0.87 e 1.75  $\mu\text{M}$ , respectivamente) de Lisozima (Sigma), utilizando tampão de ALF para completar o volume de 400  $\mu\text{L}$  totais. Em seguida, foram realizadas seis diluições seriadas das amostras, plaqueadas em ágar sangue. As placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C, em anaerobiose para contagem das colônias bacterianas sobreviventes ao tratamento. A contagem foi feita a partir da menor diluição contável, e foram calculadas as médias de cada amostra. Os experimentos foram realizados em triplicatas e repetidos para confirmação dos resultados.

### 3.5 Avaliação do efeito combinado da lactoferrina e lisozima sobre isolados de pneumococo

A fim de investigar o efeito aditivo de ALF e lisozima na lise de pneumococos, estirpes bacterianas 245/00, A66.1 e 679/99 foram incubadas na presença de lisozima (12,5 µg/mL – 0.87µM) e ALF (250 µg/mL – 3.1µM) simultaneamente, lisozima seguida de ALF ou ALF seguida de lisozima. Cada etapa da incubação foi realizada durante uma hora. As bactérias incubadas com lisozima ou ALF ou sozinhas, foram utilizadas como controles. O número de colônias foi determinado em cada grupo após o cultivo em placas de ágar sangue durante 16 horas a 37 °C (Tabela 3).

**TABELA 3** - Grupos e condições experimentais da avaliação do efeito combinado de Lisozima e ALF.

GRUPO	NOME	TEMPO DE INCUBAÇÃO/PROTEÍNA
<b>Grupo Controle</b>		Incubação por 60 minutos sem ALF e Lisozima
<b>1</b>	Grupo Lisozima	Incubação por 60 minutos com 12,5 µg/mL de Lisozima
<b>2</b>	Grupo ALF	Incubação por 60 minutos com 250 µg/mL de ALF
<b>3</b>	Grupo LIS depois ALF	Incubação por 120 minutos com 12,5 µg/mL de Lisozima seguida de incubação por mais 60 minutos com 250 µg/mL de ALF.
<b>4</b>	Grupo ALF depois LIS	Incubação por 120 minutos com 250 µg/mL de ALF seguida de incubação por mais 60 minutos com 12,5 µg/mL de Lisozima
<b>5</b>	Grupo ALF+LIS	Incubação por 60 minutos de 250 µg/mL de ALF junto com 12,5 µg/mL de Lisozima

Com o objetivo de confirmar se o efeito da combinação ALF + LIS é sinérgico, foi realizado um ensaio em placa para cálculo das concentrações inibitórias mínimas das proteínas isoladas e combinadas, tal como descrito por Branen et al., 2004. As concentrações inibitórias mínimas (MICs) foram determinadas para ALF e LZ (concentrações iniciais de 2 mg/mL e 500 µg/mL, respectivamente) sozinhas ou combinadas, nas cepas de pneumococos A66.1, 245/00, 679/99 e o RM200. As bactérias mutantes foram cultivadas em THY até atingirem  $DO_{620nm} = 0,3$ , diluídas 20 vezes em AS e aliquotadas em microplacas de 96 poços (100 µl/cavidade); em seguida, foram adicionadas

diluições seriadas de ALF ou LZ (contendo 50 µL do agente antimicrobiano e 50 µL de AS). As placas foram incubadas a 37 °C e a absorbância foi medida após 2, 4, 6 e 8 horas.

A MIC foi definida como a menor concentração em que o crescimento foi completamente inibido ( $DO \leq 0.05$ ). A fim de determinar os efeitos combinados de ALF e LZ, cada bactéria foi incubada na presença de diluições em série de uma mistura ALF-LZ, começando com a MIC dos agentes individuais durante 8 horas nas mesmas condições descritas para MIC. A concentração inibidora fracionada (FIC) foi utilizada para determinar se as ações combinadas de ALF e LZ foram sinérgicas, como se segue:  $FIC = (MIC\ ALF + LZ / MIC\ ALF\ sozinho) + (MIC\ LZ + ALF / MIC\ LZ\ sozinho)$ . Interpretações do FIC foram realizadas como descrito por Flatz et al., (2004). O sinergismo foi definido como um índice de  $FIC \leq 0.5$ ; a indiferença como um índice de  $FIC > 0,5$  a  $\leq 4$  e antagonismo como um índice de  $FIC > 4$ .

### **3.6 Imunização de camundongos BALB/c com PspAs recombinantes.**

Fragmentos de genes que codificam a região N-terminal de PspA dos clados 1, 2, 3 e 4 foram amplificados a partir das cepas 245/00, 94/01, 259/98 e P101 (Tabela 2), clonados no vetor de expressão pAE-6xHis (RAMOS et al., 2004) conforme descrito previamente por (GOULART et al., 2011), expressos em *E. coli* BL21DE<sub>3</sub> (Invitrogen) e purificados por meio de Cromatografia de afinidade ao níquel. Os primers utilizados para a amplificação dos fragmentos gênicos foram: 245/00, 94/01 e P101, Forward 5'-GAAGCGCCCGTAGCTAGTC-3' Reverse 5'-CCACATACCGTTTTCTTGTTTCCAGCC-3'; 259/98 Forward 5'-CTCGAGGAAGAAGCGCCCGTAGC-3' Reverse 5'-TAGTTAGGTACCTTTTGGTGCAGGAGCTGG-3'. Todas as proteínas incluem a região N-terminal completa, além de uma porção do domínio rico em prolina. As proteínas recombinantes foram utilizadas para imunizar camundongos BALB/c pela via intraperitoneal. Cada animal recebeu três doses de PspA (5 µg/ dose), com 12 dias de intervalo, utilizando Hidróxido de Alumínio Al<sub>2</sub>(OH)<sub>3</sub> como adjuvante (50 µg/dose). O adjuvante sozinho diluído em solução salina tamponada PBS foi utilizado como controle. As amostras de sangue foram recolhidas por punção retro-orbital, centrifugadas durante 10 minutos a 200 x g, e o soro foi armazenado a -20 °C.



### **3.7 Efeito cruzado dos anticorpos anti-PspA na morte pneumocócica por ALF**

O efeito dos anticorpos anti-PspA na morte mediada por ALF foi avaliado através da incubação de bactérias com 1% de soro de camundongos imunizados com proteínas recombinantes, na presença de ALF, como descrito na secção 3.2. O soro de camundongos injetados com  $Al_2(OH)_3$  em PBS foi utilizado para controle. A fim de investigar a extensão do efeito dos anticorpos, cada um dos isolados de pneumococo foi incubado com soros contendo anticorpos anti-PspAs clados 1 a 4, previamente inativado por incubação a 56 °C durante 30 minutos. O número de colônias viáveis foi obtido para cada amostra após uma incubação de 16 h em ágar sangue. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três ocasiões independentes.

### **3.8 Dosagem dos anticorpos anti-PspA no soro de camundongos imunizados**

Os títulos de anticorpos anti-PspA produzidos nos camundongos após a administração das PspAs recombinantes pertencentes aos clados de 1 a 4 foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA) contra as proteínas recombinantes.

Para realizar o coating, as proteínas foram diluídas em tampão Carbonato Bicarbonato 50 mM, pH=9,6 (1 µg/mL) e incubadas em placa de microplaca de 96 poços de fundo chato a 4 °C durante 16 h. Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com 400 µL de PBS (pH=7,2) acrescido de Tween®20 (0,05%). O bloqueio foi realizado com leite desnatado 10% em PBS (200 µL/poço) seguido de incubação a 37 °C por 30 min. As placas passaram novamente pelo processo de 3 lavagens em PBS-Tween®20. O soro de camundongos imunizados com as proteínas recombinantes foi adicionado em diluições sequenciais em PBS/BSA 1% (100 µL/poço) e incubado a 37 °C durante 1 h. As amostras foram novamente lavadas 3 vezes em PBS-Tween®20. Após a lavagem, foi adicionado aos poços (100 µL/poço) anti-IgG Rabbit de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) diluído em PBS/BSA (1:20000) e incubado por mais uma hora a 37 °C.

Após mais um processo de lavagem a revelação da reação enzimática foi realizada adicionando-se o substrato (100 µL/poço) contendo 0,4 mg/mL de O-fenilenediamina (OPD) diluído em 10 mL de tampão citrato de sódio (0,1 M, pH=5,0 e 10 µL de  $H_2O_2$ ). A placa foi incubada no escuro por 10 minutos em temperatura ambiente. A reação enzimática foi bloqueada com ácido sulfúrico 4 M (50 µL/poço) seguida da leitura da absorbância. Para a

leitura foi utilizado o comprimento de onda de 492 nm e o título de anticorpo foi determinado pela última diluição de soro que apresentou uma densidade óptica  $\geq 0,10$ .

### **3.9 Inibição da atividade bactericida de ALF por PspAs recombinantes**

A capacidade dos fragmentos de PspA recombinantes em suprimir o efeito bactericida da ALF foi avaliada em diferentes cepas de pneumococos, utilizando o protocolo descrito na secção 3.2, com a adição de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PspA recombinante solúvel à suspensão bacteriana, antes da incubação com ALF. Para cada um dos isolados de pneumococo, foi utilizado um fragmento de PspA pertencente ao mesmo clado da proteína expressa na superfície bacteriana.

### **3.10 Análise da interação entre a Lactoferrina e *S. pneumoniae***

Cepas de pneumococo D39 e um mutante não encapsulado e autolisina-negativo – RM200 foram descongelados, semeados em ágar sangue e incubados de um dia para o outro a 37 °C em anaerobiose. No dia seguinte, as bactérias foram transferidas em meio THY líquido e cresceram a uma densidade óptica de  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,4-0,5$ . Alíquotas de 1 mL de suspensão bacteriana foram centrifugadas (3000 x g) durante 3 minutos e lavadas com 1 mL de solução (PBS), seguido por uma nova centrifugação. Os pellets foram ressuspensos em 1 mL de PBS e alíquotas de 95  $\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana foram incubadas durante uma hora a 37 °C na presença de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de hololactoferrina (HLF, Sigma) (correspondente a 1.2 e 6.4 nM, respectivamente) que tinha sido previamente biotilada utilizando o Kit BiotinTag™ Micro Biotinylation (Sigma). As amostras foram lavadas com solução PBS e incubadas com 100  $\mu\text{L}$  de estreptavidina FITC (BD), a uma diluição de 1:100 em gelo durante 30 min. Após mais duas lavagens com PBS, as amostras foram ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de 2% de formaldeído e analisados em citômetro FACS CANTO (BD). O papel dos anticorpos anti-PspA na ligação da hololactoferrina (HLF) ao pneumococo foi examinado pela adição de 5  $\mu\text{L}$  de soros de camundongos imunizados com PspA recombinante dos clados 1 e 4 à suspensão bacteriana, antes da adição da HLF.

### **3.11 Avaliação do potencial opsonizante da lactoferrina sobre a fagocitose de *S. pneumoniae in vitro*.**

#### **3.11.1 Isolamento de Leucócitos polimorfonucleares do sangue periférico humano.**

Vinte mL de sangue total de voluntários saudáveis foram coletados em um tubo estéril contendo heparina (10 U/mL). Imediatamente após a coleta o sangue foi diluído e homogeneizado em uma solução tampão PBS/BSA na proporção 1:1. Quinze mililitros da mistura (1119 e 1077) Ficoll-Hypaque (Hystopaque®, Sigma Chemical Company), filtrado sob condições estéreis, foram introduzidos no fundo do tubo (tubo de 50 mL para centrífuga), seguido pela adição de 15 mL de sangue periférico diluído que foi centrifugado a 700 x g durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, a camada contendo as células polimorfonucleares foi aspirada com uma pipeta, restando uma camada no fundo do tubo contendo eritrócitos. A suspensão foi novamente centrifugada a 200 x g por 10 minutos, a 4 °C, e o processo repetido se necessário. A camada de células foi então ressuspensa em PBS e uma pequena alíquota foi usada para a contagem de células na câmara de Neubauer utilizando o corante azul de tripan na concentração de 0,3%. As células foram então diluídas em uma solução de 400µl de tampão PBS/BSA (0,1%) estéril, até a concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL e utilizadas no ensaio opsonofagocitose.

#### **3.11.2 Ensaio de opsonofagocitose de pneumococos por leucócitos polimorfonucleares *in vitro*.**

O ensaio de opsonofagocitose foi realizado utilizando-se protocolo adaptado de Kai et al. (2002). Pneumococos selvagens D39 e o mutante RM200, armazenados a -80°C foram descongelados, semeados em placas contendo ágar sangue e incubados a 37 °C, em anaerobiose, durante 16 h. Os cultivos foram inoculados em meio líquido Todd-Hewitt (Difco) contendo 0,5% de extrato de levedura (THY), onde foram mantidos a 37 °C até atingirem  $DO_{600nm}$  entre 0,4 – 0,5 (que corresponde a aproximadamente  $10^8$  UFC/mL); em seguida foram centrifugados a (2000 x g) por 3 minutos, descartado o sobrenadante e ressuspensa o pellet em solução PBS. Os cultivos foram incubados na presença de Hololactoferrina (HLF) na concentração de 10 mg/mL, Complemento (C3b purificado, Complement Tech) na concentração de 1.1 mg/mL e leucócitos polimorfonucleares humanos

(PMNs) ( $10^6$  células/mL) por 1 hora a 37 °C. Como controles, foram utilizados pneumococos incubados apenas com os leucócitos, na presença de HLF ou C3b isoladamente. Alíquotas de todas as amostras foram coletadas antes da adição dos PMNs para controle individual. Após a incubação, diluições seriadas foram plaqueadas em ágar sangue, e as colônias viáveis, contadas após 15 horas de incubação a 37 °C em anaerobiose.

### **3.12 Efeito da lactoferrina sobre o “clearance” de *S. pneumoniae* na mucosa nasal de camundongos.**

A avaliação dos efeitos da lactoferrina *in vivo* foi realizada através de um ensaio de colonização nasal de camundongos tratados com lactoferrina pelo pneumococo St 0603, utilizando-se uma versão modificada do protocolo descrito por Briles et al. (2005). O papel dos anticorpos anti-PspA neste modelo foi investigado pela incubação da bactéria com soro anti-PspA antes da inoculação nos animais. Os efeitos combinados da lactoferrina e anticorpos também foram investigados. Foram utilizados 40 camundongos BALB/c, fêmeas, com idade média entre 10-12 semanas. Os camundongos foram divididos em 4 grupos, que receberam apenas pneumococos em solução salina (grupo 1); apolactoferrina (ALF) e pneumococos (grupo 2); pneumococos pré-opsonizados com soro anti-PspA (grupo 3) e ALF seguida por pneumococos pré-opsonizados com soro anti-PspA (grupo 4).

Nos grupos 2 e 4, os animais foram contidos mecanicamente e inoculados pela via intranasal com 50 µl de ALF (20 µg/animal). Após uma hora,  $5 \times 10^6$  UFCs de St 0603 diluídos em 10 µl de solução salina foram administrados nas narinas de cada animal. Nos grupos 3 e 4, 150 µl da suspensão bacteriana foram incubados com 150 µL de soro anti-PspA245 (previamente mantido a 56 °C durante 30 minutos para inativação do complemento) durante 30 minutos, e em seguida administradas aos camundongos (pré-opsonização).

Após sete dias, os animais foram sacrificados com uma dose letal de uma mistura de xilazina 0,2% e ketamina 1,0% (200 µL totais) para coleta do lavado nasal e o macerado da mucosa nasal. Para a coleta do lavado nasal, um cateter foi inserido na traquéia dos animais, e as fossas nasais foram lavadas com seis gotas (aproximadamente 0,1 mL) de PBS estéril gelado. Alíquotas de 10 µL do lavado nasal foram diluídas serialmente em PBS e plaqueadas em ágar sangue. Após incubação de 16 horas a 37 °C em anaerobiose, o número de UFCs viáveis foi calculado para cada grupo. Em seguida, através da retirada do palato, o tecido das fossas nasais foi macerado em 1 mL de PBS gelado com auxílio de um pistão, diluído

serialmente e plaqueado em ágar sangue. O número de bactérias viáveis foi calculado após 16 horas de incubação nas mesmas condições utilizadas para o lavado.

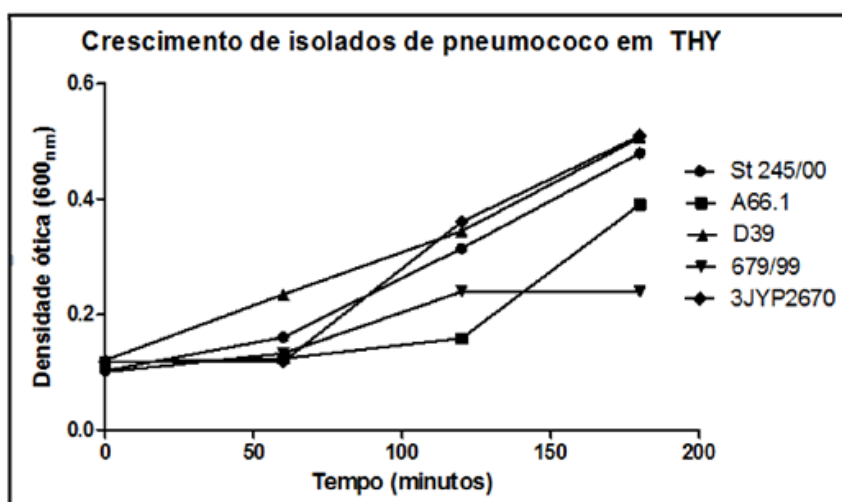
### **3.13 Análise estatística**

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e cada valor incluído corresponde à média geométrica destas réplicas. Os ensaios foram repetidos duas vezes, e as estatísticas foram aplicadas sobre os resultados de três amostras independentes. A comparação das contagens finais de pneumococos em cada grupo foi realizada por ANOVA com o teste de análise de variância de comparação múltipla de Tukey. A fim de comparar cada proteína sozinha (ALF ou LZ) contra ambas as proteínas combinadas (ALF + LZ), foi realizada análise pelo teste - t de Student. O software utilizado para a análise foi o GraphPad Prism 5.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Curvas de crescimento dos isolados de pneumococo.

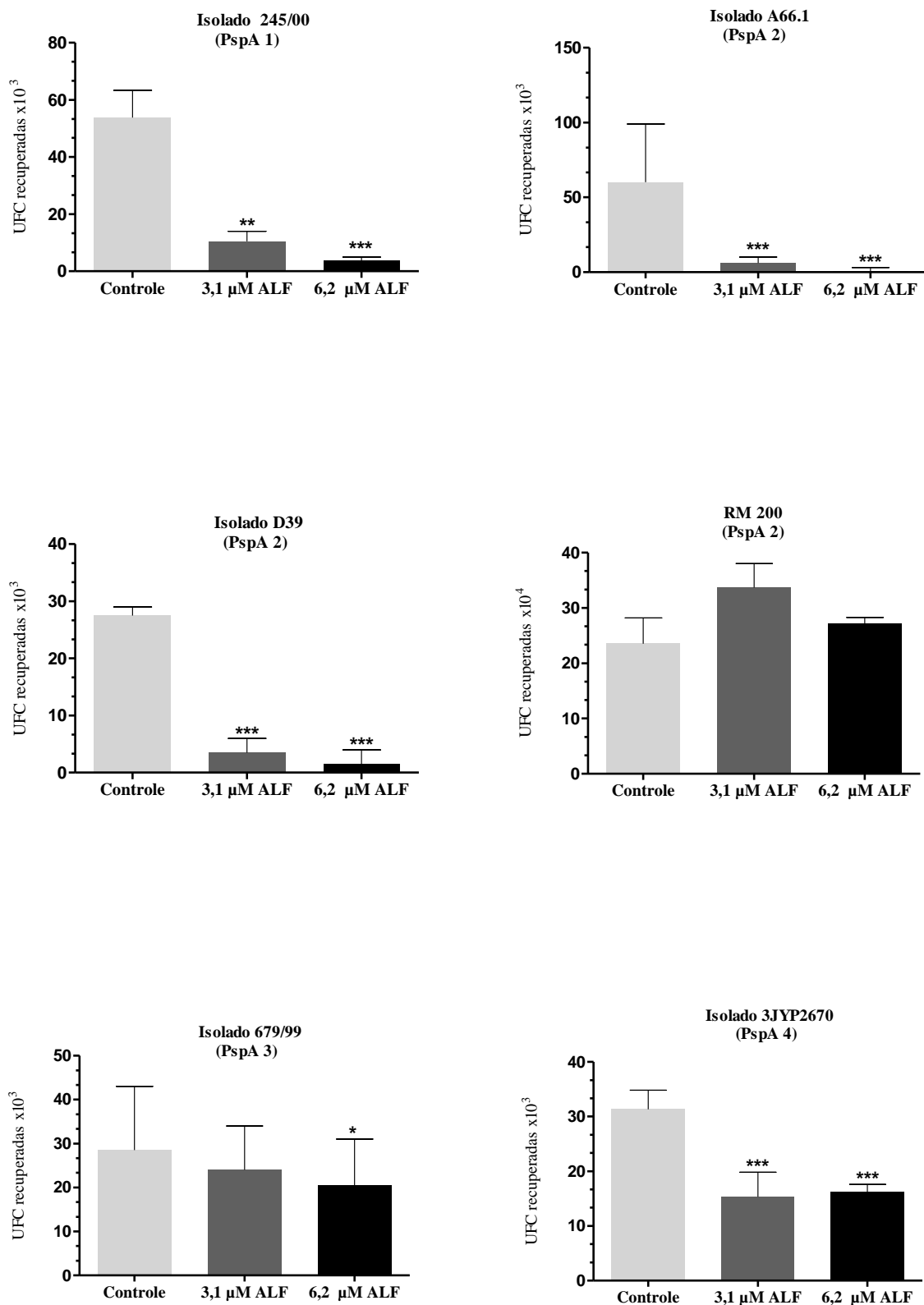
A figura 1 mostra o crescimento de cinco isolados de *Streptococcus pneumoniae* (St245/00, A66.1, D39, St679/99 e 3JYP2670) ao longo de três horas. Após esse período, todos os isolados, com exceção de St 679/99, apresentaram densidade ótica compatível com a fase log de crescimento, e foram re-diluídos para  $DO_{600\text{nm}} < 0,01$ .



**FIGURA 1-** Curvas de crescimento dos isolados de pneumococo St 245/00, A66.1, D39, 679/99 e 3JYP2670. A curva mostra o crescimento bacteriano destes isolados em relação ao tempo de cultivo, até ser atingida a fase mid log de crescimento.

### 4.2 Avaliação do efeito bactericida da ALF sobre *S. pneumoniae*

O efeito bactericida da ALF foi avaliado em cinco isolados de pneumococos encapsulados (245/00, A66.1, D39, 679/99 e 3JYP2670), e em uma bactéria não encapsulada, *knockout* para autolisina e com uma substituição em sua pneumolisina nativa por um pneumolisóide (cepa RM200), através da incubação com duas concentrações de ALF, 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$ . (Figura 2).



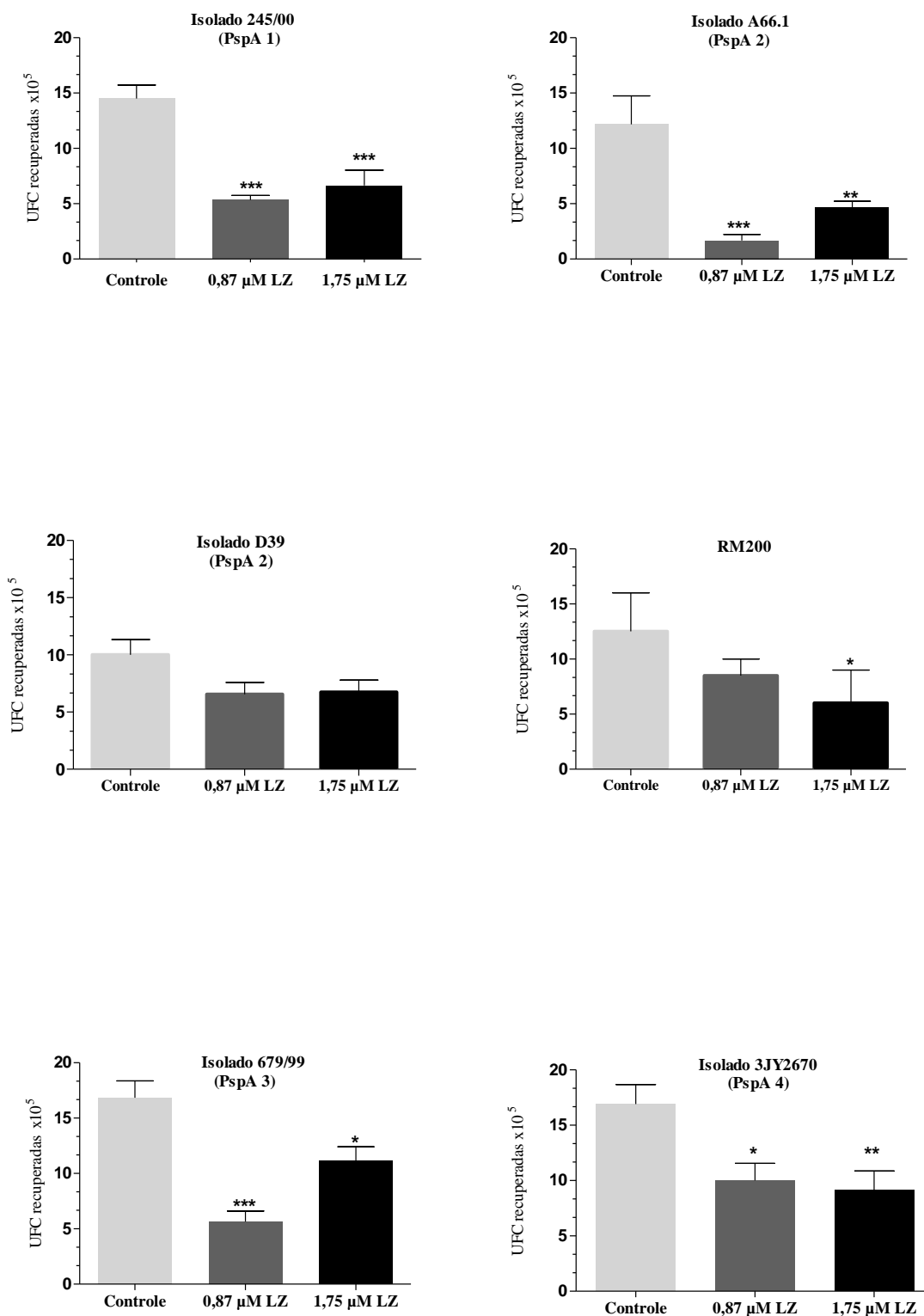
**FIGURA 2-** Suscetibilidade dos isolados de *Streptococcus pneumoniae* à ação bactericida de apolactoferrina. Os diferentes isolados de pneumococo foram incubados na presença de concentrações crescentes de ALF, plaqueados em placas de ágar sangue e incubadas por 18 h a 37 °C. As bactérias incubadas com a solução de ensaio foram utilizadas como controle. Os gráficos mostram o número de UFCs recuperadas em cada grupo após o tratamento. \* p <0,05; \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001.

É possível verificar que todos os isolados encapsulados foram sensíveis à ação da ALF, levando a uma redução significativa nas unidades formadoras de colônias (UFC). O isolado 679/99 (sorotipo 6B) se mostrou mais resistente; apenas a maior concentração (500 µg/mL) foi capaz de reduzir o número de UFCs recuperadas em relação ao controle. A bactéria mutante RM200, por sua vez, foi resistente a ação da ALF em todas as concentrações testadas. Em conjunto, os resultados mostram um variado grau de resistência à lise por ALF entre as diferentes cepas de pneumococos.

#### **4.3 Avaliação dos efeitos bactericidas da lisozima sobre *S. pneumoniae***

A suscetibilidade à lisozima também foi avaliada nas mesmas cepas de pneumococo, com resultados variáveis. Os isolados 245/00, A66.1, 679/99 e 3JYP2670 foram mais suscetíveis, mostrando uma redução significativa na contagem de UFC após incubação com a concentração mais baixa de LZ, 0.87 µM (Figura 3). RM200 demonstrou maior resistência à LZ; a lise significativa só ocorreu na maior concentração (1,72 µM) de lisozima. A cepa D39 foi a mais resistente à LZ; nenhum efeito significativo foi observado mesmo quando a concentração maior de LZ foi utilizada.

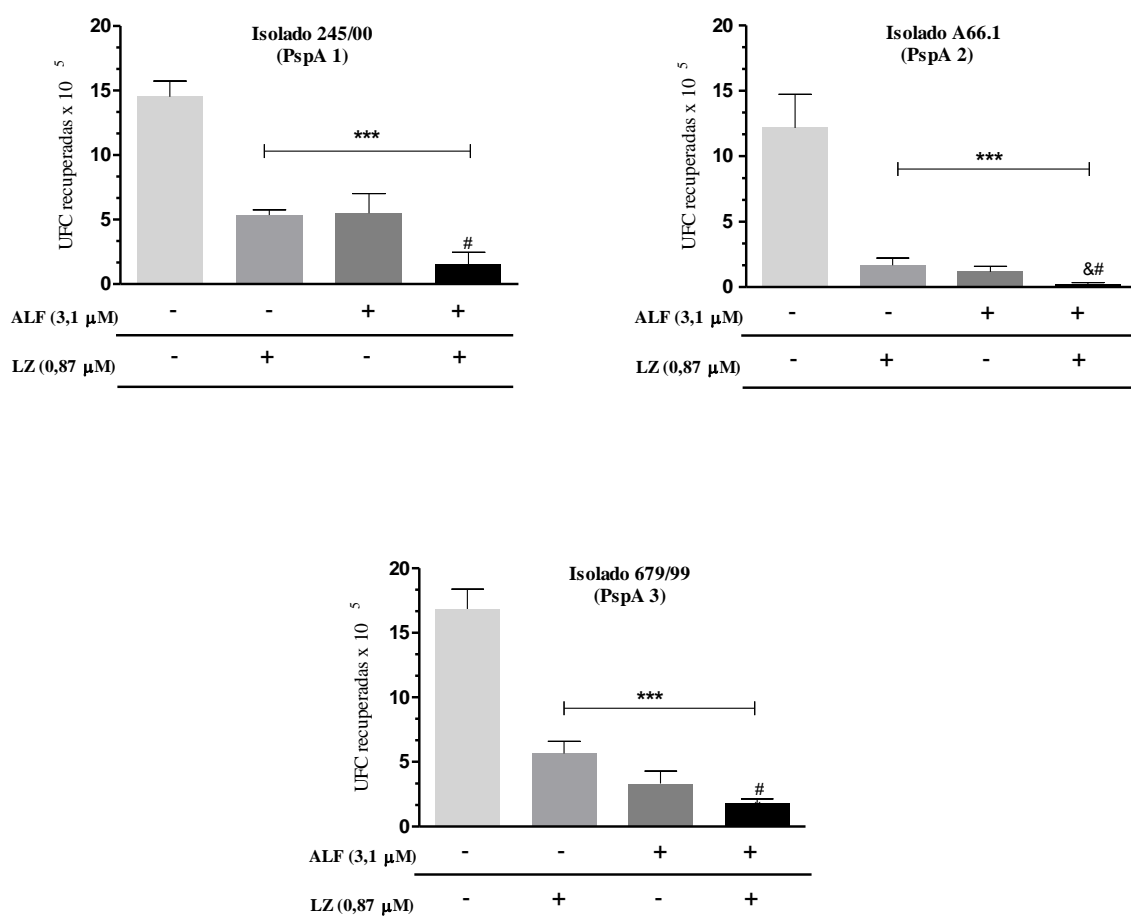




**FIGURA 3-** A suscetibilidade das estirpes de *Streptococcus pneumoniae* à ação bactericida da lisozima. Os isolados de Pneumococos de diferentes sorotipos e o mutante sem capsula e autolisina negativa RM200 foram incubados na presença de concentrações crescentes de LZ, plaqueados em placas de ágar sangue e contados. As bactérias incubadas com a solução de ensaio foram utilizadas como controle. Os gráficos mostram o número de UFCs em cada grupo após o tratamento em comparação o controle. A comparação estatística entre os grupos pela ANOVA, onde \* p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\* p < 0,001.

#### **4.4 Avaliação dos efeitos combinados da Lactoferrina e Lisozima sobre *S. pneumoniae***

O efeito combinado de ALF (3.1 $\mu$ M) e LZ (0.87  $\mu$ M) foi analisado por dois métodos diferentes: um ensaio de morte e o ensaio *checkboard*, para determinação da concentração inibitória mínima. Para o ensaio de morte, foram avaliados três isolados de pneumococos - 245/00, 679/99 e A66.1, em três regimes diferentes de incubação: i) começando com ALF seguido por LZ; ii) a partir de LZ seguido por ALF ou iii) com ambas as proteínas ao mesmo tempo. Para todas as bactérias testadas, a adição concomitante de ALF e LZ foi mais eficaz na redução da contagem de bactérias. Para a cepa A66.1, a incubação com ambas as proteínas teve o maior efeito bactericida, levando à completa eliminação da bactéria (Figura 4). Uma análise paralela dos dados revelou que o efeito combinado de ALF e LZ para esta cepa foi mais significativamente elevada do que a de cada proteína isolada. A combinação de ALF e LZ também foi estatisticamente mais eficaz do que isolados, LZ 245/00 e 679/99; no entanto, quando comparado com ALF, embora uma tendência na redução UFC esteja presente, a combinação não foi estatisticamente mais eficaz (Figura 4).



**FIGURA 4-** Efeito combinado da ALF e LZ sobre o *Streptococcus pneumoniae*. As bactérias foram incubadas na presença de 3.1 $\mu\text{M}$  de ALF, 0,87  $\mu\text{M}$  de lisozima ou a combinação de ALF e LZ, e o número de UFC foi determinado para cada amostra. As bactérias incubadas com a solução de ensaio foram utilizadas como controle. A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA, onde \* p <0,05; \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001 em relação ao grupo de controle. Para comparações entre cada proteína sozinha e a combinação, teste T de Student foi aplicado. <sup>&</sup>p <0,05 em comparação com ALF sozinha; #p <0,05 em comparação com LZ sozinha.

Os efeitos inibidores da combinação ALF-LZ em pneumococos foram avaliados através de um ensaio de checkboard. O ensaio Checkboard é um teste de microdiluição que avalia combinações dos agentes antimicrobianos ALF e LZ contra os diferentes pneumococos. Inicialmente, os MICs de ALF e LZ só foram determinadas por quatro pneumococos diferente, A66.1, 245/00, 679/99 e RM200. Como mostrado na Tabela 4, os MICs variaram entre as quatro estirpes; para ALF, RM200 foi à estirpe mais resistente, pois não mostram uma redução no diâmetro externo mesmo na concentração mais elevada de ALF, 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os efeitos de LZ nesta estirpe, por outro lado, foram mais acentuados do que os outros pneumococos. Os MICs individuais dos ALF e LZ e foram usadas como as concentrações iniciais nas combinações. Índices FIC mostram um efeito sinérgico da combinação ALF-LZ contra A66.1 (FIC = 0,25), mas este efeito foi considerada indiferente

para as outras estirpes (FIC variou de 1,5 a 2,0) (Tabela 4) . Este resultado está de acordo com o ensaio de morte, em que a combinação ALF-LZ induzida redução significativa nos níveis de UFC A66.1 quando comparado com as bactérias incubadas com cada agente anti-microbiano por si só, um efeito que não foi observado para as outras estirpes bacterianas, St 245/00 e 679/99).

**TABELA 4** - Concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; MIC) e índice de inibição fracionada das concentrações (FIC) em 8 h.

Cepa	MIC <sup>a</sup>			Índice (FIC)
	ALF	LZ	ALF + LZ	
245/00	1000	500	500 + 500	1.5
A66.1	1000	500	250 + 62.5	0.25
RM200	>2000 <sup>b</sup>	250	2000 + 250	2
679/99	2000	500	2000 + 500	2

<sup>a</sup> MICs são concentrações onde a DO média não foi maior do que 0,05 não inoculado controles.

<sup>b</sup> RM200 não mostraram inibição de crescimento em qualquer concentração testada.

#### 4.5 Efeito cruzado dos anticorpos anti-PspA sobre a ação bacteriana de ALF

A reatividade cruzada dos anticorpos anti-PspA foi determinada por ELISA contra as proteínas recombinantes. Em seguida, os mesmos anticorpos foram avaliados quanto à capacidade de influenciar os efeitos líticos da ALF sobre pneumococos portando PspAs distintas.

##### 4.5.1 Dosagem de anticorpos anti-PspA em soro de camundongos imunizados

Os anticorpos obtidos pela imunização com os fragmentos imunogênicos de PspA contendo a região N-terminal de clados 1, 2, 3 e 4 apresentaram ampla reatividade cruzada contra proteínas recombinantes de diferentes clados e famílias por ELISA (Tabela 5). Não houve diferença no reconhecimento de PspAs homólogas e heterólogas.

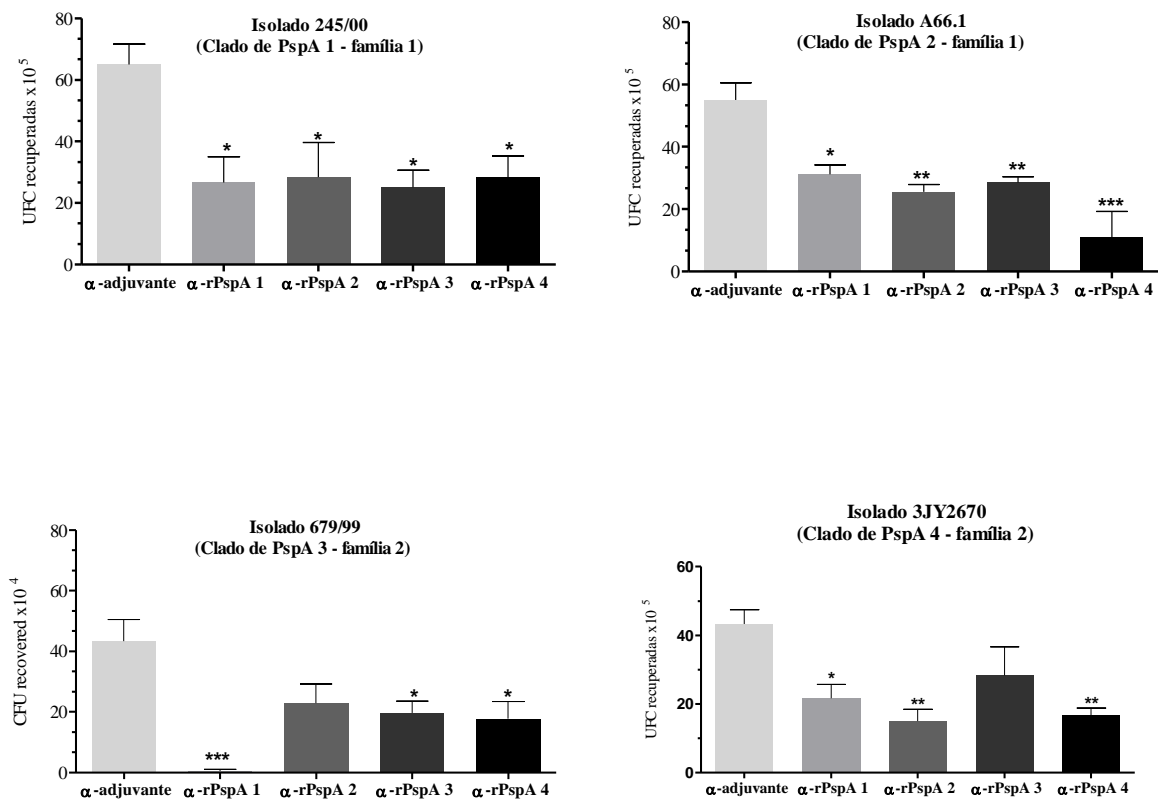
**TABELA 5** - Títulos de Anticorpos em camundongos imunizados com fragmentos de PspA recombinantes.

Anti-soros	Antígeno de revestimento			
	rPspA1	rPspA2	rPspA3	rPspA4
Alum	5,3	5,3	5,3	5,3
Anti-PspA1	13,60	12,32	11,32	11,32
Anti-PspA2	12,32	13,32	11,32	11,32
Anti-PspA3	11,32	13,32	13,32	12,32
Anti-PspA4	11,32	12,32	12,32	12,32

Os resultados das titulações de anticorpos são apresentados como  $\text{Log}^2$ .

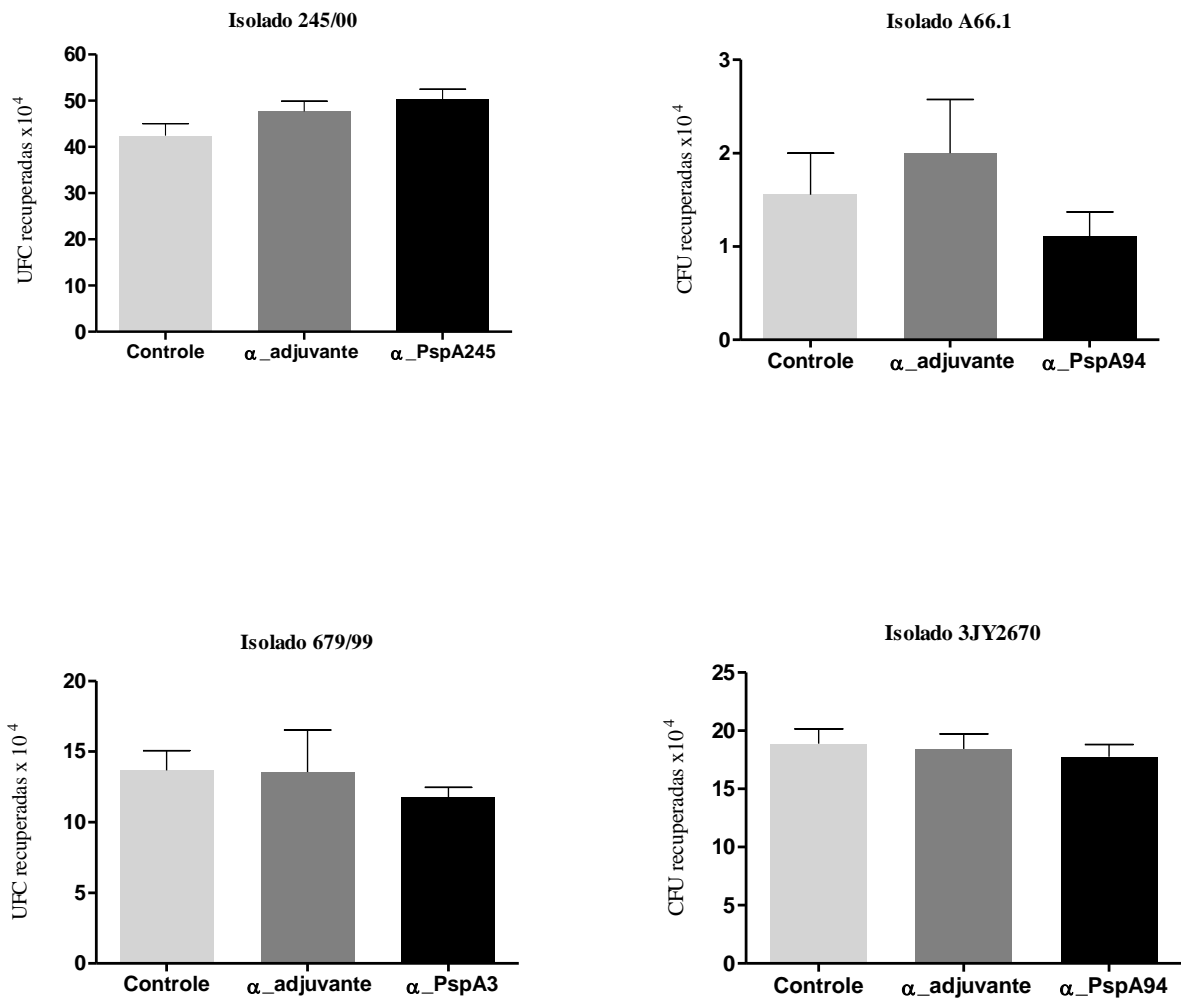
Depois de avaliada a reatividade cruzada dos soros contra PspAs recombinantes, a capacidade dos anticorpos anti-PspA em aumentar a morte mediada por ALF foi investigada em quatro cepas de pneumococos de diferentes sorotipos, expressando PspAs clados de 1 a 4. Os soros de camundongos imunizados com fragmentos de PspA 245 (clado 1), 94 (clado 2), PspA3 (clado 3), P101 (clado 4) foram incubados com pneumococos expressando moléculas PspA homólogas e heterólogas, na presença de ALF, e o número de colônias viáveis, contadas após incubação em placas de ágar sangue.

Após a incubação dos pneumococos com anti-PspA e ALF, foi observado um aumento na morte bacteriana para todos os soros (Figura 5). Uma redução significativa nas contagens bacterianas foi observada quando o soro anti-PspA foi semelhante ao clado da PspA expressa na superfície pneumocócica. Além disso, a maioria dos anticorpos anti-PspA foram capazes de aumentar a morte de pneumococos por ALF em bactérias que expressam moléculas de PspA de outros clados e famílias. Este efeito foi observado para as PspAs de família 1 (cepas 245/00 e A66.1) (Figura 5, painéis superiores), e em menor proporção em bactérias contendo PspAs de família 2 (679/99 e JYP2670) (Figura 5, painéis inferiores).



**FIGURA 5-** Influência de anticorpos anti-PspA na morte pneumocócica por ALF. Isolados de pneumococo que expressam os clados de PspA 1, 2, 3 e 4 foram incubados na presença de ALF e anticorpos contra fragmentos PspA dos clados 1 a 4 e plaqueados. O número de bactérias sobreviventes é demonstrado em UFC. Os pneumococos incubados com ALF e o soro de ratos imunizados com adjuvante em solução salina foi utilizado como controle. A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA, onde \* p <0,05; \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001.

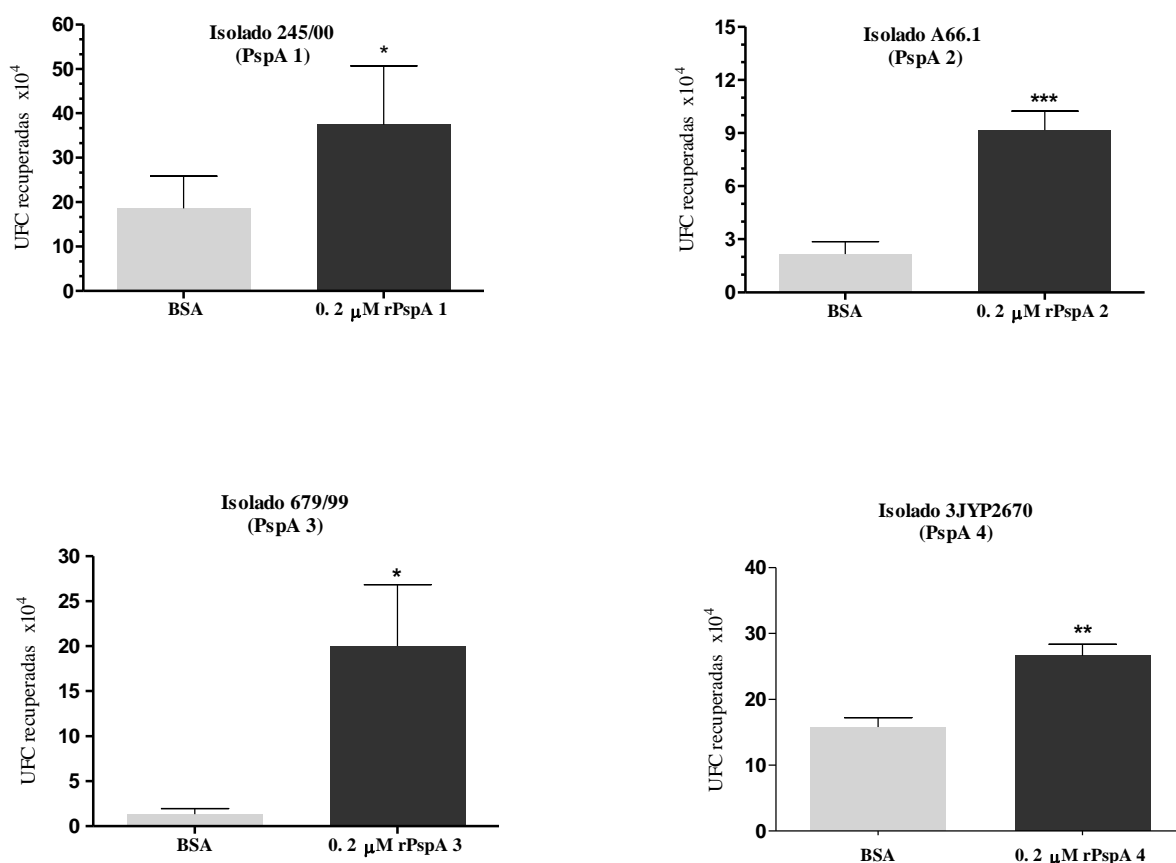
A fim de confirmar que o efeito lítico observado foi devido à presença da lactoferrina e não pela ação aglutinante direta dos anticorpos anti-PspA, foi realizado um ensaio controle, onde as bactérias foram incubadas com 1% de anti-PspA diluído em solução de ensaio durante 1h e plaqueadas. A incubação das cepas bacterianas com anti-PspA não reduziu o número de bactérias, indicando que não ocorreu agregação nas condições testadas (Figura 6).



**FIGURA 6-** Influência de anticorpos anti-PspA na morte de *Streptococcus pneumoniae*. Isolados de pneumococo foram incubados na presença de anticorpos contra fragmentos de PspA e plaqueados. O número de bactérias sobreviventes é mostrado para cada bactéria. Pneumococos incubados com o soro de camundongos imunizados com adjuvante em solução salina foram utilizados para comparação. Também foram incluídas as bactérias sem tratamento (controle). A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA, onde \* p <0,05; \*\* p <0,01 e \*\*\* p <0,001.

#### 4.6 A inibição da atividade de ALF por PspAs

A fim de confirmar se os fragmentos recombinantes de PspA utilizados para a produção dos anticorpos são capazes de interagir com a lactoferrina, os mesmos isolados de pneumococo avaliados na seção 4.6 foram utilizados em um ensaio de morte por ALF na presença dos fragmentos de PspA clados 1 a 4. Com a exceção da cepa 245/00 (clado 1), a adição da molécula PspA homóloga levou a uma inibição significativa da morte bacteriana por ALF em todas as bactérias testadas (Figura 7), quando comparada com o grupo controle (tratado com BSA). De modo geral os fragmentos de rPspAs solúveis adicionados ao cultivo bacteriano competiram com a PspA presente na superfície bacteriana e se ligaram à ALF impedindo a liberação dos peptídeos catiônicos líticos.



**FIGURA 7-** A inibição do efeito bactericida da ALF por fragmentos PspA recombinantes. As bactérias foram incubadas na presença de ALF e fragmentos PspA recombinantes ou BSA (controle). A UFC indica o número de colônias viáveis após o tratamento para cada amostra. A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA, onde \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Com base nos estudos de Shaper et al., (2004).

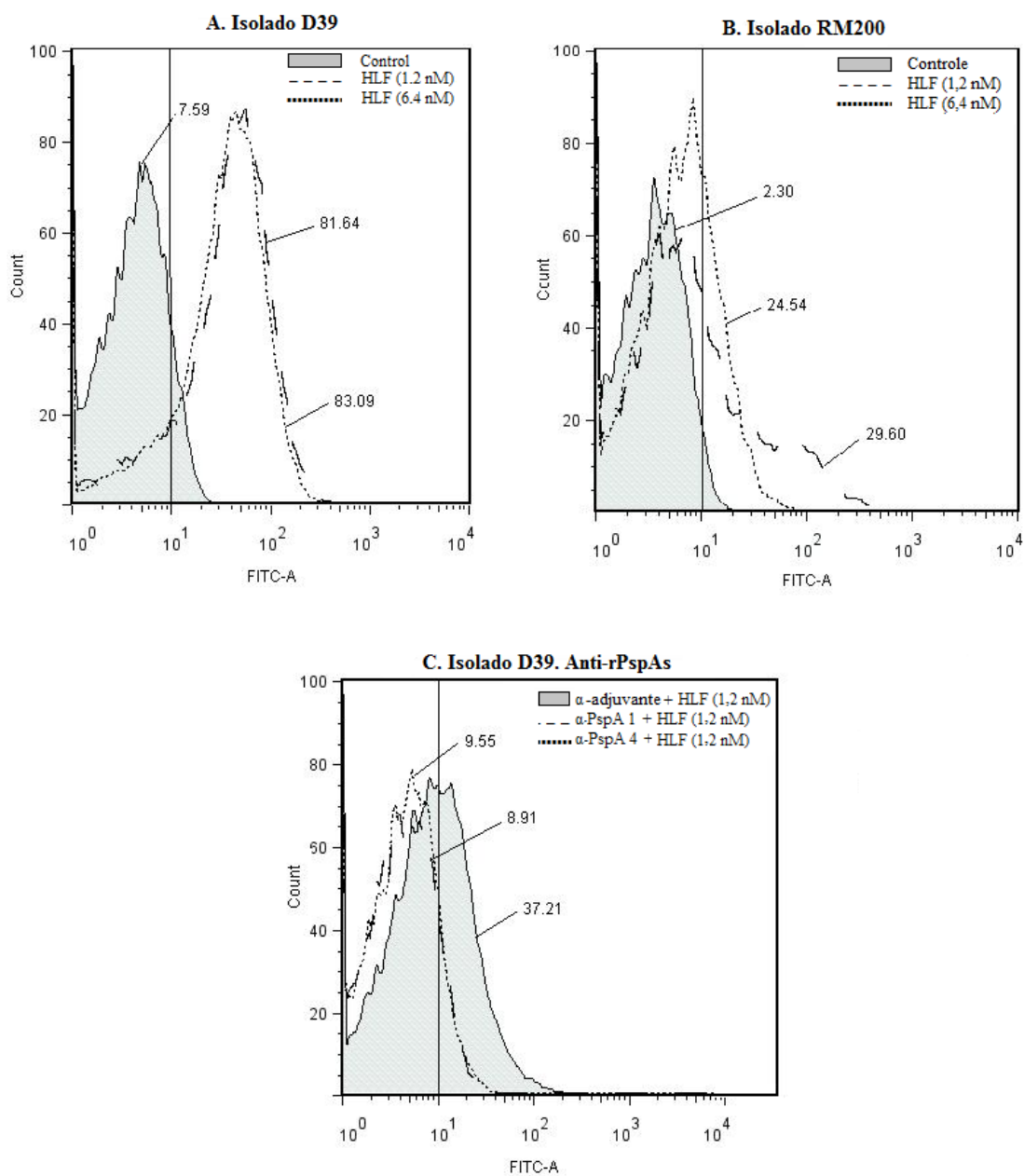


#### **4.7 A ligação da Lactoferrina ao *Streptococcus pneumoniae***

A ligação da hololactoferrina ao pneumococo foi avaliada por citometria de fluxo utilizando duas cepas bacterianas, St D39 e o mutante RM200. O uso da forma holo (saturada de ferro) da lactoferrina previne os efeitos líticos desta molécula, mas mantém a sua capacidade de ligação. A HLF ligou-se eficientemente à cepa D39, levando a um aumento de dez vezes na percentagem de células positivas em comparação com o grupo de controle (81,64% nos grupos HLF contra 7,59% no controle) (Figura 8A). A eficácia de ligação não foi influenciada pela concentração da HLF; uma percentagem semelhante de bactérias positivas foi obtida com as duas concentrações de HLF (1,2 e 6,4 nM) (Figura 8A).

Para a cepa mutante RM200, a ligação da HLF também ficou dez vezes maior do que no grupo controle (29,6% no HLF tratado versus 2,3% do controle), já a capacidade de ligação da HLF nesta cepa foi menor do que a observada na D39 (figura 8B).

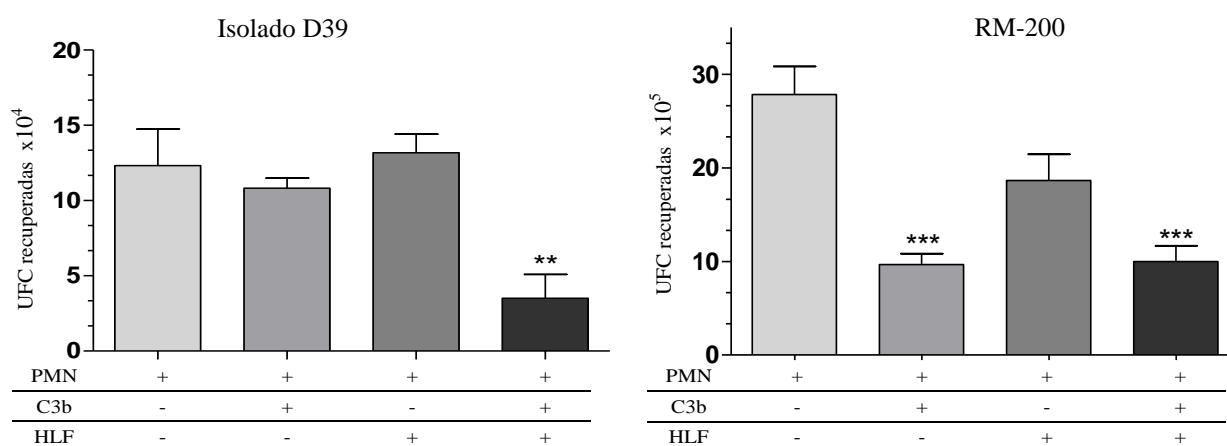
O efeito dos anticorpos anti-PspA na competição da ligação com a HLF foi avaliada na incubação da D39 com anticorpos produzidos contra PspAs das família - 1(PspA1) e família - 2(PspA4), anteriormente à incubação com HLF (1,2 nM). Quando os anticorpos anti-PspA foram adicionados à suspensão bacteriana, a ligação da HLF à superfície bacteriana foi fortemente inibida (8,91% de células positivas contra 37,21% no controle, o grupo de soro não imune) (Figura 8C). Este efeito foi independente do tipo PspA, uma vez que os soros contra moléculas de ambas as principais famílias PspA - 1 (PspA 1) e 2 (PspA 4) - foram capazes de inibir a interação HLF com D39 na mesma medida (8,91 e 9,55% de células positivas, respectivamente).



**FIGURA 8-** Ligação de HLF ao pneumococo é inibida na presença de anticorpos anti-PspA. Pneumococos D39 (A) e o isolado não-encapsulado e autolisina-negativo RM200 (B) foram incubadas na presença de duas concentrações de hololactoferrina humana biotinizada - HLF 1.2 nM (linhas tracejadas) e 6.4 nM (linhas pontilhadas), e FITC - estreptavidina. A percentagem de bactérias fluorescentes é mostrada para cada amostra. As bactérias incubadas com solução de ensaio e FITC - estreptavidina foram utilizadas como controle (áreas cinza sombreado). (C) O isolado D39 foi incubado com anti-soros contendo os anticorpos contra PspAs de clados 1 (linha a tracejada) e 4 (linha pontilhada), seguido por HLF (1.2 nM). O soro de camundongos imunizados com adjuvante em solução salina foi utilizado como controle e é representado pelas áreas de cinza sombreado.

#### 4.8 Avaliação do efeito opsonizante da lactoferrina sobre a fagocitose de *Streptococcus pneumoniae*

A ação opsonizante da lactoferrina sobre *S. pneumoniae* foi investigada através de um ensaio de opsonofagocitose *in vitro*, no qual leucócitos polimorfonucleares de sangue periférico humano foram incubados com pneumococos na presença de HLF e C3b isoladamente ou em conjunto. A Figura 9 mostra a contagem de colônias viáveis do isolado St D39 e RM200 após os tratamentos. Pode-se observar que, para a cepa D39, embora a adição de HLF ou C3b isoladamente não teve efeito significativo sobre a fagocitose das bactérias, a combinação entre esses dois elementos HLF e C3b levou a uma redução significativa dos pneumococos pelos fagócitos. No mutante RM200 observa-se uma redução com o C3b isolado, que se manteve quando foram adicionados HLF e C3b concomitantemente.

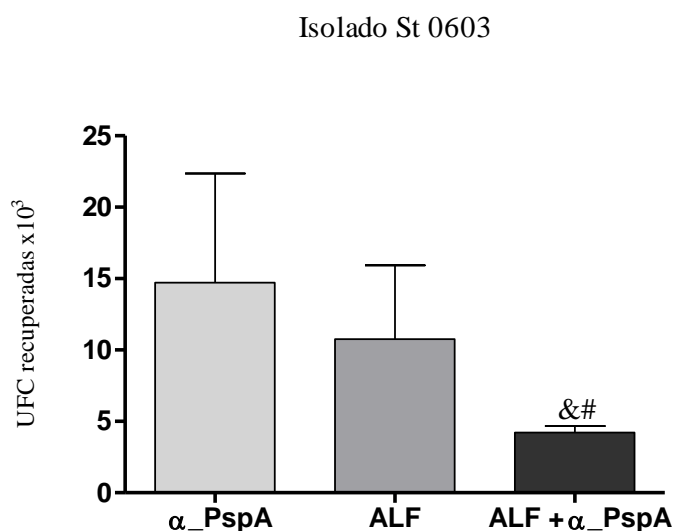


**FIGURA 9-** Ação opsonizante da HLF e C3b sobre a fagocitose de *S pneumoniae*. Pneumococos D39 e RM200 foram incubados na presença de HLF, C3b ou da combinação HLF+C3b, seguido pela adição de leucócitos polimorfonucleares (PMN). O número de colônias bacterianas viáveis é mostrado para cada amostra após o tratamento. Como controle, foram utilizadas bactérias incubadas apenas com os fagócitos sozinhos (controle PMN). A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA, onde (\*\*p=<0,01), (\*\*\*)p=<0,0015) em comparação ao controle.

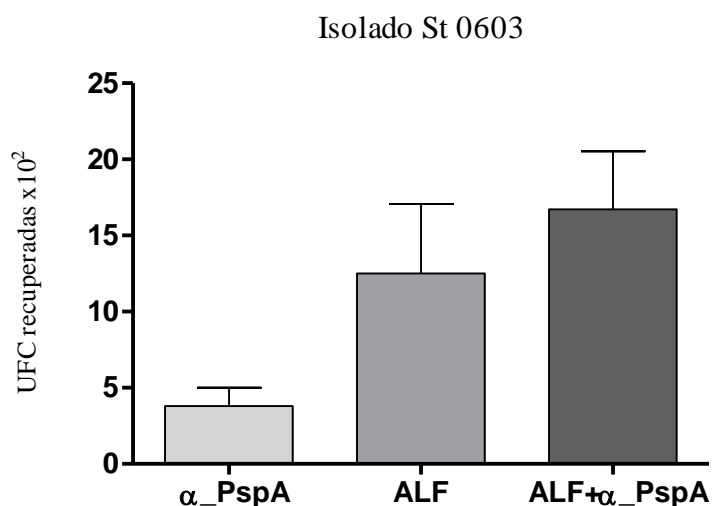
#### 4.9 Efeito da lactoferrina sobre o clearance de *S. pneumoniae* na mucosa nasal de camundongos.

Os efeitos *in vivo* da lactoferrina foram avaliados em um ensaio de colonização nasal por pneumococo em camundongos tratados com ALF. O papel dos anticorpos anti-PspA neste modelo também foi investigado. A Figura 10 mostra os resultados da contagem das bactérias

removidas da mucosa nasal dos camundongos. Foi observada uma redução significativa no número de bactérias do macerado da mucosa dos animais tratados com ALF e utilizando pneumococos pré-opsionizados com soro anti-PspA245, em comparação com os grupos que receberam apenas ALF e bactérias ( $p = 0,1091$ ) e apenas bactérias opsonizadas ( $p = 0.0823$ ), utilizando teste t de Student. Este efeito não foi observado nos lavados nasais (Figura 11).



**FIGURA 10-** Influência de anticorpos anti-PspA no clearance pneumocócico por ALF na mucosa nasal de camundongos. Isolado de pneumococo St 0603 foi incubado na presença de ALF e anticorpos contra fragmentos PspA dos clados 1 e utilizado no desafio intranasal de camundongos não-imunizados. O número de bactérias sobreviventes é demonstrado em UFC. Para comparações entre a proteína sozinha e a combinação com anticorpo, teste t de Student foi aplicado. &  $p < 0,001$  em comparação com ALF sozinha; #  $p < 0,001$  em comparação com  $\alpha$ \_PspA sozinha.



**FIGURA 11-** Influência de anticorpos anti-PspA no clearance pneumocócico por ALF nos lavados nasais da mucosa de camundongos. Isolado de pneumococo St 0603 foi incubado na presença de ALF e anticorpos contra fragmentos PspA dos clados 1 e utilizado no desafio intranasal de camundongos não-imunizados. O número de bactérias sobreviventes é demonstrado em UFC. A comparação entre os grupos foi realizada por ANOVA, onde \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 5 DISCUSSÃO

O *Streptococcus pneumoniae* é um colonizador importante da nasofaringe de indivíduos saudáveis, de onde pode contaminar áreas estéreis e causar uma série de doenças. Entre os mecanismos imunológicos de eliminação da bactéria na mucosa, as proteínas bactericidas lactoferrina (ALF) e lisozima (LZ) desempenham um papel importante no controle da colonização bacteriana através de diferentes mecanismos. O efeito lítico do ALF é mediado por proteólise da molécula, com a subsequente liberação de peptídeos catiônicos que danificam a membrana bacteriana, enquanto a LZ cliva componentes da parede celular microbiana (ORSI, 2004). Na verdade, ALF e LZ demonstraram agir sinergicamente contra ambos os agentes patógenos gram-negativos e gram-positivos (ELLISON et al., 1991; LEITCH et al., 1999; LEITCH e WILLCOX, 1998).

Inicialmente foi realizada a padronização do cultivo bacteriano, conforme descrito por Shaper et al., (2004). O cultivo até a fase exponencial, seguido de rediluição e cultivo até início da fase log tem por objetivo potencializar a exposição da PspA, minimizando os efeitos críticos da cápsula, uma vez que o pneumococo é capaz de modular a expressão de certos fatores de virulência, incluindo cápsula e a PspA de acordo com o ambiente em que se encontra e a fase da infecção. Esse processo, conhecido como variação de fase permite à bactéria sobreviver em diversos sítios do hospedeiro. Durante a colonização, o pneumococo reduz a produção da cápsula, permitindo uma maior interação de suas adesinas de superfície com receptores do hospedeiro, assim o cultivo nas condições descritas é importante para reproduzir as características que a bactéria adquire na mucosa, durante infecções naturais.

O presente estudo investigou a suscetibilidade do pneumococo a ALF e LZ in vitro. A incubação de diferentes estirpes de pneumococos com concentrações crescentes de ALF levou a uma redução significativa no número de todos os isolados testados. Observou-se uma pequena variação na morte bacteriana por ALF, sendo o isolado do sorotipo 6B (679/99) mais resistente do que do sorotipo 2, 3 e os 14.

Um estudo anterior sobre a susceptibilidade do pneumococo a ALF não encontrou qualquer correlação com a cápsula ou tipo PspA (SHAPER et al., 2004), sugerindo que outros fatores podem contribuir para essa variabilidade. Curiosamente, a RM200 – mutante sem capsula e autolisina negativa, foi muito resistente à morte pela ALF. Este efeito não pode ser explicado por uma maior exposição da PspA na superfície bacteriana, porque a RM200 teve uma interação significativamente menor com a lactoferrina, quando comparada a cepa D39

encapsulada, por citometria de fluxo. Pelo nosso conhecimento, este é o primeiro relato do efeito da lactoferrina sobre uma cepa de pneumococo sem cápsula, e reforça o papel de outros fatores não identificados na resistência bacteriana à morte pela ALF.

A susceptibilidade do pneumococo à LZ também foi avaliada, e mostrou-se variável entre as diferentes cepas de pneumococo; D39 foi a mais resistente à morte por LZ, seguida pela cápsula negativa RM200 que foi susceptível apenas para a maior concentração de LZ, enquanto que 245/00, 679/99 A66.1 foram sensíveis em ambas as concentrações de LZ. Estudos anteriores demonstraram a mesma variabilidade sobre a resistência do pneumococo a lisozima (LEE et al., 2004), mostraram que os isolados de pneumococos de sorotipos 6B e 3 foram completamente susceptíveis a lisozima, a uma concentração de 50 µg em ensaios de difusão radial (BRANEN e DAVISON, 2004). Em outro estudo, Davis et al., (2008) investigou os efeitos da lisozima sobre TIGR4, uma cepa de pneumococo que demonstrou ser muito resistente à morte mediada por lisozima. Neste trabalho, a resistência à lisozima foi relacionada com a expressão de dois peptidoglicano modificados PgdA e Adr (DAVIS et al., 2008).

Em seguida, foram investigados os efeitos combinados da ALF e LZ em três pneumococos, St 245/00, A66.1 e 679/99. A ação concomitante de ALF e LZ em A66.1 levou a uma redução significativa no número de bactérias. Para os outros dois pneumococos, 245/00 e 679/99, a atividade bactericida da combinação ALF-LZ foi significativamente superior ao da LZ sozinha, mas não houve diferença significativa do efeito da ALF sozinha. Este resultado está de acordo com as observações que A66.1 foi ligeiramente mais susceptíveis aos efeitos isolados de ALF e LZ. Esse resultado sugere uma ação em sinergia da lactoferrina com outros componentes da mucosa como a lisozima, na qual ALF libera peptídeos catiônicos que danificam a membrana e a lisozima rompe o arcabouço da parede celular bacteriana, diminuindo a chance de sobrevivência do micro-organismo no hospedeiro.

Os estudos sobre os efeitos combinados de lactoferrina e lisozima em diferentes bactérias tiveram resultados variáveis. Leitch e Willcox (1998) observou um efeito antimicrobiano sinérgico da apolactoferrina e lisozima humana em *Staphylococcus epidermidis* e Branen e Davidson (2004) ao trabalhar com outra bactéria Gram-positiva, *Listeria monocytogenes*, não encontrou nenhum aumento na morte bacteriana mediada pela combinação de LF e LZ em ensaio de checkboard. Embora o uso de lactoferrina bovina e lisozima de ovo de galinha neste último trabalho pode parcialmente ser responsável pelas diferenças na ação antimicrobiana, estes resultados sugerem que o potencial antimicrobiano

combinado da lactoferrina e lisozima são altamente dependentes da espécie da bactéria. (LEITCH e WILLCOX, 1998; BRANEN e DAVIDSON, 2004).

A fim de determinarem-se os efeitos combinados da ALF e LZ foram sinérgicos, foi executado o ensaio checkboard, comparando-se os MICs individuais e combinadas da ALF e LZ em quatro cepas pneumocócicas. Um efeito sinérgico foi observado para A66.1, com um índice de FIC 0,25. Este resultado reforça o efeito da combinação ALF-LZ sobre este pneumococo A66.1. Também de acordo com os resultados do ensaio, este efeito sinérgico não foi observado nos outros pneumococos. Em particular, RM200 mostrou-se muito resistente à morte por ALF, enquanto LZ era bactericida para esta cepa.

As Proteínas de superfície de pneumococo A (PspA) foram identificadas como proteína ligante a lactoferrina humana. Hakansson e cols utilizaram estirpes negativas de PspA e PspC para demonstrar que a ligação da LF foi completamente dependente da expressão de PspA (MIYAJI et al., 2012). Eles também conseguiram realizar a localização de HLF e PspA na superfície pneumocócica usando microscopia confocal. Ren et al. (2003) mostrou que os pneumococos expressando a PspA da família 1 apresentaram uma afinidade mais elevada à HLF do que as estirpes da família 2, enquanto que as estirpes mutantes expressando moléculas PspA truncadas não ligaram-se à lactoferrina (REN et al., 2003).

Os nossos dados confirmam o papel da PspA na ligação da HLF aos pneumococos, e indicam que a cápsula também é importante para esta interação, uma vez que a cepa RM200 não-encapsulada mostrou ligação à HLF menor que a D39. Uma possível explicação para este resultado pode ser uma alteração na conformação da PspA com a superfície bacteriana na ausência da cápsula, o que poderia limitar sua capacidade de interagir com a lactoferrina. Já a adição de anticorpos anti-PspA foi capaz de inibir a ligação da HLF à superfície bacteriana, possivelmente isso é devido ao bloqueio dos locais específicos dessa proteína a qual é responsável pela interação com HLF.

PspA protege parcialmente o pneumococo contra a morte por ALF e peptídeos líticos derivados de ALF. O mecanismo proposto para a proteção mediada por PspA contra os efeitos da lactoferrina envolve a inibição da clivagem da ALF, impedindo a subsequente liberação de peptídeos catiônicos que desestabilizam a membrana pneumocócica e conduzem à lise bacteriana. Também tem sido demonstrado que os anticorpos contra fragmentos recombinantes de PspA podem aumentar a morte do pneumococo por ALF, possivelmente por bloqueio dos locais de interação entre estas duas proteínas. (SHAPER et al., 2004).

Diversos estudos sugerem a participação da PspA na colonização por pneumococo. Um ensaio de colonização experimental em humanos demonstrou uma forte associação entre a presença de anticorpos anti-PspA e a proteção contra colonização nos voluntários (HAKANSSON et al., 2001). Estes dados sugerem uma possível interação com componentes da mucosa do hospedeiro nas fases iniciais da infecção. Foi demonstrado que PspA é capaz de ligar-se à lactoferrina. A ligação entre PspA e a lactoferrina livre de ferro (Apolactoferrina) protege parcialmente a bactéria dos efeitos líticos desta proteína (REN et al., 2012; FERREIRA et al., 2010). Foi demonstrado ainda que a adição de anticorpos anti-PspA bloqueia o efeito protetor desta proteína, potencializando a ação bactericida da apolactoferrina sobre o patógeno (BRILES et al., 2003). No entanto, devido à variabilidade estrutural e sorológica da PspA, faz-se necessária uma investigação da amplitude dos efeitos protetores de PspA na presença da lactoferrina e anticorpos anti-PspA, assim como de PspAs recombinantes solúveis sobre isolados de *S. pneumoniae*.

Outra evidência do papel da PspA na proteção contra a colonização foi obtida a partir de ensaios de colonização e re-colonização por pneumococo em indivíduos saudáveis (MCCOOL et al., 2002). Demonstrou-se que a colonização experimental de voluntários saudáveis induz a produção de anticorpos contra PspA, e que a presença de tais anticorpos no soro pré-imune proporcionou aos voluntários resistência à colonização. Num estudo mais recente, a imunização de camundongos com PspA como uma vacina de DNA protegeu contra a colonização pneumocócica, enquanto que a imunização passiva com soros de camundongos imunizados com a vacina de DNA foi capaz de reduzir a contagem de bactérias na nasofaringe, evidenciando o papel de protetor dos anticorpos anti-PspA neste modelo (FERREIRA et al., 2010).

Apesar da crescente evidência do potencial de PspA como vacina candidata contra a colonização pneumocócica, as moléculas de PspA exibem variabilidade estrutural e sorológica, o que poderia de certa forma limitar a cobertura potencial de formulações à base de PspA. A região N-terminal da proteína, especialmente os últimos 100 aminoácidos, exibe um padrão de variação de sequência que foi utilizado para classificar PspA em seis clados, os quais foram agrupados em três famílias (HOLLINGSHEAD et al., 2000). Estudos, que avaliaram o nível de reatividade cruzada e / ou proteção cruzada dentre os clados e famílias da PspA, proporcionaram resultados variáveis (DARRIEUX et al., 2007; MORENO et al., 2010; GOULART et al., 2011; NABORS et al., 2000).



Portanto, é importante determinar o grau do efeito cruzado dos anticorpos para PspA na mediação da morte pneumocócica por ALF. Inicialmente, o reconhecimento cruzado do anticorpo foi determinado por ELISA contra fragmentos de PspA recombinantes pertencentes a famílias 1 e 2 (clados 1, 2, 3 e 4). Todos os soros mostraram uma forte reação com fragmentos de PspA recombinantes de ambas as famílias. Estudos diferentes que analisam o nível de reatividade cruzada entre as moléculas de PspA chegaram a resultados variáveis. Nabors et al, (2000), revelou que o reconhecimento cruzado dos soros de coelhos imunizados foi maior entre PspAs da mesma família, enquanto que a imunização de voluntários saudáveis com um fragmento PspA clado 2 induziu anticorpos com capacidade para reagir com PspAs de ambas as famílias (NABORS et al., 2000). Darrieux et al., (2008) e Goulart et al., (2011) demonstraram que PspAs de uma mesma família ou do mesmo clado apresentam graus variáveis de reatividade cruzada.

Foi demonstrado que a adição de anticorpos a um fragmento de PspA de clado 2 resultou num aumento da morte de pneumococos por ALF em pneumococos com PspA homólogos (SHAPER et al., 2004). A fim de determinar se o clado das PspA poderia influenciar na capacidade dos anticorpos de aumentar a lise bacteriana por ALF tendo quatro subtipos diferentes de PspAs. Todos os anticorpos anti-PspA foram avaliados quanto à sua capacidade de aumentar a morte, mediada por lactoferrina, de pneumococos expressando diferentes PspAs. Todos os soros foram capazes de aumentar a morte bacteriana, em certo grau. Este efeito foi mais marcante nas cepas que expressam PspAs de família 1 (clados 1 e 2), em que todos os soros anti-PspA foram capazes de aumentar a morte por ALF. No entanto, este experimento necessita ser mais abrangente para contemplar as outras cepas de pneumococos, a fim de confirmar o efeito de reação cruzada.

Além disso, os fragmentos de PspA solúveis foram capazes de inibir a lise por ALF competindo com as moléculas de PspA na superfície bacteriana. Este resultado confirma os dados apresentados por Shaper et al., (2004) mostrando que os fragmentos de PspAs utilizados neste trabalho são capazes de se ligar à lactoferrina.

O presente trabalho avaliou também o potencial opsonizante da lactoferrina sobre *S. pneumoniae*, através de um ensaio de opsonofagocitose por leucócitos polimorfonucleares de sangue periférico humano *in vitro*. Os resultados desta análise sugerem que a ação opsonizante da LF pode ser ampliada na presença de complemento; foi observada uma redução significativa no número de pneumococos após a adição combinada de HLF e C3b por

ação dos fagócitos. Por outro lado, a adição de HLF sozinha não foi capaz de aumentar a fagocitose pelos polimorfonucleares *in vitro*.

Considerando que a colonização é um passo necessário em todas as doenças pneumocócicas, em longo prazo a colonização nasal pelo pneumococo envolve mais do que uma simples adesão de superfície, na verdade, conforme descrito por Briles et al, (2005) requer uma invasão do tecido da mucosa, o que possibilita ao patógeno expor os componentes da superfície bacteriana como a PspA e outros fatores de virulência, minimizando os efeitos da cápsula, uma vez que o pneumococo é capaz de modular esta expressão, conhecido como variação de fase, permitindo-o inibir o sistema complemento e a fagocitose.

Em continuidade aos experimentos *in vitro*, o presente trabalho avaliou a ação da lactoferrina *in vivo*, através de um modelo de colonização de camundongos utilizando o isolado St 0603. Esse modelo de colonização já foi utilizado para avaliação do potencial protetor de candidatos vacinais contra pneumococo (MOFFITT et al., 2011).

As nossas observações indicam uma ação mais invasiva dos tecidos nasais pelo pneumococo St 0603 de sorotipo 6B do que superficial, uma vez que a maioria das bactérias recuperadas foi a partir do macerado da mucosa. Esta invasão local dos tecidos da mucosa durante a colonização já foi descrita anteriormente em modelos de colonização utilizando outros isolados de pneumococo (BRILES et al., 2005).

A inoculação nasal da lactoferrina previamente ao desafio bacteriano não foi capaz de proteger os camundongos contra colonização; no entanto, no grupo de animais submetidos à administração de bactérias pré-opsonizadas com soro anti-PspA após a inoculação da ALF, foi observado um número significativamente menor de pneumococos nos tecidos nasais. Estes resultados indicam que o papel protetor da lactoferrina contra colonização por pneumococo depende da presença de anticorpos anti-PspA.

Em conjunto, os dados do presente trabalho demonstram que a presença de anticorpos anti-PspA potencializa os efeitos bactericida e opsonizante da ALF sobre *S. pneumoniae*. Dessa forma, a imunização com PspA poderia induzir proteção não apenas contra doença invasiva, mas também contra a colonização, através da ativação dos mecanismos de “clearance” mediados por ALF; as respostas protetoras na mucosa podem limitar a transmissão bacteriana, bem como reduzir a doença pneumocócica.

Estes dados reforçam PspA como um potencial candidato para inclusão numa vacina à base de proteínas contra pneumococos, levando à produção de anticorpos que aumentam a morte bacteriana por ALF. Além disso, a presença de LZ em secreções mucosas pode exercer

um efeito aditivo na combinação com lactoferrina, resultando numa eliminação pneumocócica mais eficaz, dependendo do tipo de pneumococo.

## 6 CONCLUSÃO

- Os isolados de pneumococo apresentaram graus variáveis de sensibilidade à ação bactericida de ALF e lisozima;
- A adição de fragmentos recombinantes de PspA reduziu a ação lítica de ALF sobre os pneumococos, possivelmente por se ligarem competitivamente à ALF, inibindo sua autólise com posterior liberação de peptídeos bactericidas;
- A adição de anticorpos contra diferentes porções de PspA foi capaz de ampliar a ação lítica da ALF sobre todos os isolados de pneumococo avaliados, incluindo aqueles que expressam proteínas de famílias diferentes;
- A capacidade dos anticorpos anti-PspA em aumentar a lise bacteriana por ALF não depende da similaridade entre a PspA utilizada para a produção dos anticorpos e aquela expressa na superfície bacteriana, sugerindo um efeito cruzado;
- A ação combinada de ALF e lisozima foi mais eficaz em reduzir o número de bactérias viáveis do que cada proteína isoladamente, sugerindo um sinergismo entre estas proteínas em sua ação bactericida contra o pneumococo;
- A combinação entre HLF (hololactoferrina) e fator C3b do complemento foi capaz de aumentar a fagocitose de *S pneumoniae* por leucócitos polimorfonucleares humanos *in vitro*, sugerindo uma ação opsonizante;
- ALF foi capaz de reduzir a colonização nasal por pneumococo em camundongos apenas na presença de anticorpos anti-PspA.

Em conjunto, os resultados indicam que a lactoferrina contribui para a eliminação dos pneumococos, por sua ação lítica direta, sozinha ou combinada à lisozima, e pelo efeito opsonizante, quando combinada ao fator C3b do sistema complemento. Os resultados também sugerem que anticorpos anti-PspA são capazes de aumentar o efeito lítico da lactoferrina sobre o pneumococo. Estes mecanismos podem estar envolvidos no "clearance" bacteriano na mucosa oral, sugerindo a possibilidade de se utilizar a proteína PspA como vacina contra a colonização da mucosa.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTOR, J. K.; HWANG, S. A.; KRUZEL, M. L. Lactoferrin as a natural immune modulator, **Curr. Pharm. Des.** 15 (17), 1956-1973, 2009.

AFONSO, E. T.; MINAMISAVA, R.; BIERRENBACH, A. L.; ESCALANTE, J. J.; ALENCAR, A. P.; DOMINGUES, C. M. et al. Effect of 10-valente pneumococcal vaccine on pneumonia among children. **Brazil Emerg Infect Dis.** 589-97, 2013.

AUTRIAN, R. Pneumococcal polysaccharide vaccines. **Infect Dis**, 11:598-602, 1989.

BAKER, E. N. and H. M. BAKER. "A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin." **Biochimie.** 91(1): 3-10, 2009.

BAKER, E. N. Lactoferrin: a multi-tasking protein par excellence, **Cell Mol. Life Sci.** 62 (22) 2529-2530, 2005.

BAKER, E. N. and H. M. BAKER. "Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin." **Cell Mol Life Sci.**62(22): 2531-9, 2005.

BAKER, H. M., C. J. BAKER, et al. "Metal substitution in transferrins: specific binding of cerium (IV) revealed by the crystal structure of cerium-substituted human lactoferrin." **J Biol Inorg Chem** 5(6): 692-8, 2000.

BALTIMORE, R.S.; SHAPIRO, E. D. Pneumococcal infections. 2nd ed. New York: **Plenum Medical Book Co**, 1991.

BEALL, B.; GHERARDI, G.; FACKLAM, R. R.; HOLLINGSHEAD, S. K. Pneumococcal PspA sequence types of prevalent multiresistant pneumococcal strains in the United States and of internationally disseminated clones. **J Clin Microbiol**, 38:3663-3669, 2000.

BEREZIN, E. N. et al. Distribution of Streptococcus pneumoniae serotypes in nasopharyngeal carriage and in invasive pneumococcal disease in São Paulo, Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, v. 26, n. 7, p. 643-5, 2007.

BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 3, p. 144-54, 2004.

BOGAERT, D. et al. Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 9, p. 3316-20, 2001.

BOSARGE, J. R.; WATT, J. M.; MCDANIEL, D. O.; SWIATLO, E.; MCDANIEL, L. S. Genetic immunization with the region encoding the alpha-helical domain of PspA elicits protective immunity against *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun**, 69:5456–5463, 2001.

BRAIDO, F.; BELLOTTI, M.; MARIA, A. D. “The role of Pneumococcal vaccine”, Pulmonary **Pharmacology and Therapeutics**, 21:608–615, 2008.

BRANDILEONE, M. C. Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis. **JID**, 187:1206-12, 2003.

BRANDILEONE, M. C.; ANDRADE, A. L.; TELES, E. M.; ZANELLA, R. C.; YARA, T. I.; DI FABIO, J. L.; HOLLINGSHEAD, S. K. Typing of pneumococcal surface protein A (PspA) in *Streptococcus pneumoniae* isolated during epidemiological surveillance in Brazil: towards novel pneumococcal protein vaccines. **Vaccine**, 22:3890-3896, 2004.

BRANDILEONE, M. C. C.; CASAGRANDE, S. T.; GUERRA, M. L. L. S.; ZANELLA, R. C.; ANDRADE, A. L. S. S.; DI FABIO, L. Increase in numbers of b-lactam-resistant invasive *Streptococcus pneumoniae* in Brazil and the impact of conjugate vaccine coverage. **Journal of Medical Microbiology**, London, 55:567-574, 2006.

BRANEN, J. K. AND DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. **Int J Food Microbiol**. 90(1): p. 63-74, 2004.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S.; BROOKS, W. A. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine**, 18:1707–1711, 2000a.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; SWIATLO, E.; BROOKS, W. A.; SZALAI, A.; VIROLAINEN, A.; MCDANIEL, L. S.; BENTON, K. A.; AERTS, P. C.; DIJK, H. V.; CRAIN, M. J. Pneumococcal proteins PspA and PspC: their potential for use as vaccines, In A. Tomasz (ed.), *Streptococcus pneumoniae*, molecular biology and mechanisms of disease. **Mary Ann. Liebert**, New York, p. 253–260, 2000b.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; KING, J.; SWIFT, A.; BRAUN, P. A.; PARK, M. K.; FERGUSON, L. M.; NAHM, M. H.; NABORS, G. S. Immunization of humans with

PspA elicits antibodies, which passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA. **J Infect Dis**, 182:1694-1701, 2000c.

BRILES, D. E., et al. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. **J Infect Dis**. 188(3): p. 339-48, 2003.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; PATON, J.; ADES, E.; NOVAK, L; VAN GINKEL, F.; BENJAMIN, W. J. Immunizations with pneumococcal surface protein A and pneumolysin are protective against pneumonia in a murine model of pulmonary infection with *Streptococcus pneumoniae*. **J. Infect. Dis**, 188:339–348, 2004.

BRILES, D. E., et al., Nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* includes subpopulations of surface and invasive pneumococci. **Infect Immun**. 73(10): p. 6945-51, 2005.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nat Rev Microbiol**. 3(3): p. 238-50, 2005.

CARDOZO, D. M. et al. Prevalence and risk factors for nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* among adolescents. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 2, p. 185-9, 2008.

CDC. Pneumococcal Disease. In: Atkinson W HJ, McIntyre L, Wolfe S, editor. **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases**. 10 ed. Washington DC: Public Health Foundation; 2007.

COLE, A. M., et al., Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid, **J. Immunol**. 169 (12), 6985-6991, 2002.

COLES, C. L. et al. Nasopharyngeal carriage of *S. pneumoniae* among young children in rural Nepal. **Trop Med Int Health**, v. 14, n. 9, p. 1025-33, 2009.

CROOK, D. W.; SPRATT, B. G. Multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Br Med Bull**, 54(3):595-610, 1998.

DARRIEUX, M.; MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, L. M.; LOPES, A. P.; REN, B.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; LEITE, L. C. Fusion proteins containing family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that

correlates with antibody-mediated enhancement of complement deposition. **Infect Immun**, 75:5930-5938, 2007.

DARRIEUX, M.; MORENO, A. T.; FERREIRA, D. M.; PIMENTA, F. C.; ANDRADE, A. L. S.; LOPES, A. P. Y.; LEITE, L. C. C.; MIYAJI, E. N. Recognition of pneumococcal isolates by antisera raised against PspA fragments from different clades. **Journal of Medical Microbiology**. 57(3):273-278, 2008.

DAWSON, C. What is a pneumococcus? In Tuomanen E MT, Morrison DA, Spratt BG ed. **The Pneumococcus**. 2 ed. Washington, D.C.: ASM, p. 30-48, 2004.

DAVIS, K.M., et al., Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by *Streptococcus pneumoniae*. **PLoS Pathog**, 4(12): p. 1000241, 2008.

ELLISON, R. T., 3RD AND T. J. GIEHL. "Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme." **J Clin Invest** 88(4): 1080-91, 1991.

FERREIRA, D. M., OLIVEIRA, M. L. S., MORENO, A. T., HO, P. L., BRILES, D. E. MIYAJI, E. N. Protection against nasal colonization with *Streptococcus pneumoniae* by parenteral immunization with a DNA vaccine encoding PspA (Pneumococcal surface protein A). **Microb Pathog**. 48(6): p. 205-13, 2010.

FLATZ, L. et al., Ceftriaxone acts synergistically with levofloxacin in experimental meningitis and reduces levofloxacin-induced resistance in penicillin-resistant pneumococci, *J. Antimicrob. Chemother.* 53 (2) 305 e 310, 2004.

FRANCO, C. M. et al. Survey of nonsusceptible nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates in children attending day-care centers in Brazil. **Pediatr Infect Dis J**, v. 29, n. 1, p. 77-9, 2010.

GALLI, S. J., M. TSAI, et al. "The development of allergic inflammation." **Nature** 454(7203): 445-54, 2008.

GANZ, T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract, **J. Clin. Invest.** 109 (6), 693-697, 2002.

GARCIA, S. et al. Pneumococcal disease and vaccination in the Americas: an agenda for accelerated vaccine introduction. **Rev Panam Salud Publica**, v. 19, n. 5, p. 340-8, 2006.



GIFFORD, J. L., H. N. HUNTER, et al. "Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties." **Cell Mol Life Sci** 62(22): 2588-98, 2005.

GOMEZ-BARRETO, D. et al. Carriage of antibiotic-resistant pneumococci in a cohort of a daycare center. **Salud Publica Mex**, v. 44, n. 1, p. 26-32, 2002.

GONZALEZ-CHAVEZ, S. A.; AREVALO-GALLEGOS, S.; RASCON-CRUZ, Q. Lactoferrin: structure, function and applications, **Int. J. Antimicrob. Agents** 33 (4), 301 e 1-8, 2009.

GOR, D. O.; DING, X.; BRILES, D. E.; JACOBS, M. R.; GREENSPAN, N. S. Relationship between surface accessibility for PpmA, PsaA, and PspA and antibody-mediated immunity to systemic infection by *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, 73:1304-1312, 2005.

GOULART, C.; DARRIEUX, M.; RODRIGUEZA, D.; PIMENTAD, F. C.; BRANDILEONE, M. C. C.; ANDRADEF, A. L.; LEITE, L. C. Selection of family 1 PspA molecules capable of inducing broad-ranging cross-reactivity by complement deposition and opsonophagocytosis by murine peritoneal cells. **Vaccine**, 29:1634–1642, 2011.

HAKANSSON, A., et al., Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A. **Infect Immun**, 69(5): p. 3372-81, 2001.

HAMMERSCHMIDT, S., et al., Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, 67(4): p. 1683-7, 1999.

HAUSDORFF, W. P. et al. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. **Clin Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 100-21, 2000.

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

HIROSE, T. E. MALUF, E. M. C. P., RODRIGUES, C. O. Pneumococcal meningitis: epidemiological profile pre- and post-introduction of the pneumococcal 10-valent conjugate vaccine. **J Pediatr** (Rio J) 91(2): 130-135, 2014.

JARVA, H.; JOKIRANTA, T. S.; WURZNER, R.; MERI, S. Complement resistance mechanisms of streptococci. *Mol. Immunol*, 40:95–107, 2003.

JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. Antimicrobial properties of lactoferrin, *Biochimie* 91 (1), 19-29, 2009.

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

JOLLES, P.; JOLLES, J. What's new in lysozyme research? *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 63, p. 165-189, 1984.

JOLLES, P. Recent developments in the study of lysozymes. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 3, f. 1, p. 28-36, 1964.

KADIOGLU, A.; WEISER, J. N.; PATON, J. C.; ANDREW, P. W. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6:288-301, 2008.

KAI, K., KOMINE, et al. "Lactoferrin stimulates *Staphylococcus aureus* killing activity of bovine phagocytes in the mammary gland." *Microbiol Immunol* 46(3): 187-94, 2002.

KAYUSHINA, R. L.; STEPINA, N.D.; BELYAEV, V.V.; YU I. KHURGIN, YU I. – X-ray reflectivity study of Self-assembly of ordered Lysozyme films. *Crystallography Reports* 41 (1), 146, 1996.

KERR, A. R.; PATERSON, G. K.; MCCLUSKEY, J.; IANNELLI, F.; OGGIONI, M. R.; POZZI, G.; MITCHELL, T. J. The contribution of PspC to pneumococcal virulence varies between strains and is accomplished by both complement evasion and complement-independent mechanisms. *Infect. Immun*, 74:5319 – 5324, 2006.

KIJLSTRA, A. AND S. H. JEURISSEN. "Modulation of classical C3 convertase of complement by tear lactoferrin." *Immunology* 47(2): 263-70, 1982.

KOLBERG J., AASE A., RODAL G., LITTLEJOHN J. E., JEDRZEJAS M. J. Epitope mapping of pneumococcal surface protein A of strain Rx1 using monoclonal antibodies and molecular structure modelling. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Dec 5;39(3):265-73, 2003.

LAVAL, C. B. et al. Serotypes of carriage and invasive isolates of *Streptococcus pneumoniae*

in Brazilian children in the era of pneumococcal vaccines. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 1, p. 50-5, 2006.

LEE, H.Y., et al., Antimicrobial activity of innate immune molecules against *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and nontypeable *Haemophilus influenzae*. **BMC Infect Dis**, 4: p. 12, 2004.

LEGRAND, D. et al. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses, **Cell Mol. Life Sci.** 62 (22), 2549-2559, 2005.

LEITCH, E.C. AND M.D. WILLCOX, Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme. **J Med Microbiol**, 48(9): p. 867-7, 1999.

LEITCH, E.C. AND M.D. WILLCOX, Synergic antistaphylococcal properties of lactoferrin and lysozyme. **J Med Microbiol**, 47(9): p. 837-42, 1998.

LEGRAND, D., E. ELASS, et al. "Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function." **Biochem Cell Biol** 84(3): 282-90, 2006.

LOW, D. E. Changing trends in antimicrobial-resistant pneumococci: it's not all bad news. **Clin Infect Dis**, 41(4):228-33, 2005.

LUNDSTROM T.S., SOBEL J. D.: Antibiotics for gram-positive bacterial infections: vancomycin, quinupristin-dalfopristin, linezolid, and daptomycin. **Infect Dis Clin North**; 18, p. 651, 2004.

MALLEY, R. Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: implications for vaccine development. **J. Mol. Med. Review**, 88:135-142, 2009.

MARANA, S. R.; CANÇADO, F. C.; VALÉRIO, A. A., FERREIRA, C.; TERRA, W. R.; BARBOSA, J. A. Crystallization, data collection and phasing of two digestive lysozymes from *Musca domestica*. **Acta Cryst.**, f. 62, p. 750-752, 2006.

MARRIOT H. M.; DOCKRELL D. H. *Streptococcus pneumoniae*: the role of apoptosis in host defense and pathogenesis. **Int J. Biochem Cell Biol.**, 38(11):1848-1854, 2006.

MCCOOL, T.L., et al., The immune response to pneumococcal proteins during experimental human carriage. **J Exp Med**, 195(3): p. 359-65, 2002.

MCDANIEL, L. S.; SWIATLO, E. Pneumococcal disease: pathogenesis, treatment, and prevention. **Infect. Dis., Clin. Pract.**, 12:93–98, 2004.

MIRZA, S., S. K. HOLLINGSHEAD, et al. "PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin." **Infect Immun** 72(9): 5031-5040, 2004.

MIRZA, S., L. WILSON, et al. "Serine protease PrtA from *Streptococcus pneumoniae* plays a role in the killing of *S. pneumoniae* by apolactoferrin." **Infect Immun** 79(6): 2440-50, 2011.

MITCHELL, T. J.; ALEXANDER, J. E.; MORGAN, P. J.; ANDREW, P. W. Molecular analysis of virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. **Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.** 26, p. 62S–71S, 1997.

MIYAJI, E.N., et al., Serotype-independent pneumococcal vaccines. **Cell Mol Life Sci**, 2012.

MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, A. P.; BRANDILEONE, M. C.; DIAS, W. O.; LEITE, L. C. Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades. **Infect Immun**, 70:5086-5090, 2002.

MOFFITT, K. L.; GIERAHN, T. M.; LU, Y.; GOUVEIA, P.; ALDERSON, M.; FLECHTNER, J. B.; HIGGINS, D. E.; MALLEY, R. Th17- based vaccine design for prevention of *Streptococcus pneumoniae* colonization. **Cell Host Microbe**, 17;9(2): 158-165, 2011.

MOLLERACH, M.; REGUEIRA, M.; BONOFILIO, L.; CALLEJO, R.; PACE, J.; DI FABIO, J. L.; HOLLINGSHEAD, S.; BRILES, D. E. Invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Argentinian children: serotypes, families of pneumococcal surface protein A (PspA) and genetic diversity. **Epidemiol Infect**, 132:177-184, 2004.

MORENO, A. T.; OLIVEIRA, M. L.; FERREIRA, D. M.; HO, P. L.; DARRIEUX, M.; LEITE, L. C. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clin Vaccine Immunol** 17(3):439–46, 2010.

NABORS, G. S.; BRAUN, P. A.; HERRMANN, D. J.; HEISE, M. L.; PYLE, D. J.; GRAVENSTEIN, S.; SCHILLING, M.; FERGUSON, L. M.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E.; BECKER, R. S. Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies. **Vaccine**, 18:1743-1754, 2000.

NIYONSABA, F.; OGAWA, H. Protective roles of the skin against infection: Implication of naturally occurring human antimicrobial agents b-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. **J. Dermatological Science**, v. 40, p. 157-168, 2005.

OMS – Organização Mundial da Saúde. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization – WHO position paper. **Weekly epidemiological record**, 82(12): 93-104, 2007.

OBARO, S.; ADEGBOLA, R. The pneumococcus: carriage, disease and conjugate vaccines. **J Med Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 98-104, 2002.

ORSI, N., The antimicrobial activity of lactoferrin: current status and perspectives. **Biometals**. 17(3): p. 189-96, 2004.

OZDEMIR, B. et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy Turkish infants. **J Infect**, v. 56, n. 5, p. 332-9, 2008.

PARASKAKIS, I. et al. Serotypes and antimicrobial susceptibilities of 1033 pneumococci isolated from children in Greece during 2001-2004. **Clin Microbiol Infect**, v. 12, n. 5, p. 490-3, 2006.

PARKER, D.; PRINCE, A. Innate immunity in the respiratory epithelium, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45 (2) 189-201, 2011.

PIMENTA, F. C.; RIBEIRO-DIAS, F.; BRANDILEONE, M. C.; MIYAJI, E. N.; LEITE, L. C.; SGAMBATTI, A. L. Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during an ongoing surveillance study of children in Brazil. **J Clin Microbiol**, 44:2838-2843, 2006.

PLETZ, M. W.; MAUS, U.; KRUG, N. "Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species", **International Journal of Antimicrobial Agents**, 32(3):199-206, 2008.

PRICE, K. E.; CAMILLI, A. Pneumolysin localizes to the cell wall os *Streptococcus pneumoniae*. **J. Bacteriol.**, 191(7):2163-2168, 2009.

RAINARD, P. "Activation of the classical pathway of complement by binding of bovine lactoferrin to unencapsulated *Streptococcus agalactiae*." **Immunology** 79(4): 648-52, 1993.

RAMOS, C. R., et al., A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res.** 37(8): p. 1103-9, 2004.

REIS, J. N. et al. Transmission of Streptococcus pneumoniae in an urban slum community. **J Infect**, v.57, n. 3, p. 204-13, 2008.

REN, B., et al., The absence of PspA or presence of antibody to PspA facilitates the complement-dependent phagocytosis of pneumococci in vitro. **Clin Vaccine Immunol.** 19(10): p. 1574-82, 2012.

REN, B., A. J. SZALAI, et al. "Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface." **Infect Immun** 72(1): 114-22, 2004.

REN, B.; SZALAI, A. J.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. **Infect Immun**, 72:114-122, 2004a.

REN, B., MCCRORY, M. A.; PASS, C.; BULLARD, D. C.; BALLANTYNE, C. M.; XU, Y.; BRILES, D. E.; SZALAI, A. J. The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. **J. Immunol.**, 173:7506–7512, 2004b.

REN, B.; SZALAI, A. J.; THOMAS, O.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. Both family 1 and family 2 PspA proteins can inhibit complement deposition and confer virulence to a capsular serotype 3 strain of *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**, 71:75 – 85, 2003.

ROSENOW, C.; RYAN, P.; WEISER, J. N.; JOHNSON, S.; FONTAN, P.; ORTQVIST, A.; MASURE, H. R. Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol**, 25:819–829, 1997.

SENKOVICH, O., et al., Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein a provides insight into microbial defense mechanism. **J Mol Biol.** 370(4): p. 701-13, 2007.

SHAPER, M. et al., PspA protects Streptococcus pneumoniae from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected], **Infect. Immun.** 72 (9) 5031-5040, 2004.

SINNOTT, M. L. – Glycosyl Group Transfer in Enzyme Mechanisms, M. L. Page and Williams eds. **The Royal Soc. Of Chem.** London, P.259, 1993.

SYRJANEN, R. K. et al. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Finnish children younger than 2 years old. **J Infect Dis**, v. 184, n. 4, p. 451-9, 2001.

SYROGIANNOPOULOS, G. A. et al. Carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Greek infants and toddlers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 19, n. 4, p. 288-93, 2000.

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

TAI, S. S. *Streptococcus pneumoniae* protein vaccine candidates: properties, activities and animal studies. **Crit Rev Microbiol** 32:139-153, 2006.

TAI, S. S., C. J. LEE, et al. "Hemin utilization is related to virulence of *Streptococcus pneumoniae*." **Infect Immun** 61(12): 5401-5, 1993.

TART, R. C.; MCDANIEL, L. S; RALPH, B. A.; BRILES, D. E. Truncated *Streptococcus pneumoniae* PspA molecules elicit cross-protective immunity against pneumococcal challenge in mice. **J. Infect, Dis.** 173:380-386, 1996.

TAVARES W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfecciosos. 3 ed. São Paulo: **Atheneu**; 2001.

TOMAZ, A. *Streptococcus pneumoniae*. Molecular biology & mechanisms of disease. New York: **Mary Ann Liebert**, 2000.

THORNTON, J.; MCDANIEL, L. S. THP-1 monocytes up-regulate intercellular adhesion molecule 1 in response to pneumolysin from *Streptococcus pneumoniae*. **Infect. Immun**, 73:6493–6498, 2005.

TU, Y.; LI, F.; GOICOECHEA, S.; WU, C. The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. **Mol Cell Biol.**, 19:2425–2434, 1999.

TUOMANEM, E. Molecular and cellular biology of pneumococcal infection. **Curr. Opin. Microbiol.**, 2:35-39, 1999.

UCHIDA, K., R. MATSUSE, et al. "Immunochemical detection of human lactoferrin in feces as a new marker for inflammatory gastrointestinal disorders and colon cancer." **Clin Biochem** 27(4): 259-64, 1994.

VALENTI, P. AND G. ANTONINI. "Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack." **Cell Mol Life Sci** 62(22): 2576-87, 2005.

VEERHUIS, R. AND A. KIJLSTRA. "Inhibition of hemolytic complement activity by lactoferrin in tears." **Exp Eye Res** 34(2): 257-65, 1982.

VELA CORAL, M. C.; FONSECA, N.; CASTANEDA, E.; DI FABIO, J. L.; HOLLINGSHEAD, S. K.; BRILES, D. E. Pneumococcal surface protein A of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates from Colombian children. **Emerg Infect Dis**, 7:832-836, 2001.

WARD, P. P., S. URIBE-LUNA, et al. "Lactoferrin and host defense." **Biochem Cell Biol** 80(1): 95-102, 2002.

WATSON, D.A.; MUSER, D.M.; VERHOEF, J. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 14:479–90, 1995.

YOSHIOKA, CRISTINA R. M; MARTINEZ, MARINA B; BRANDILEONE, MARIA C. C; RAGAZZI, SELMA B; GUERRA, MARIA L. L. S; SANTOS, SILVIA R; SHIEH, HUEI H; GILIO, ALFREDO E. Análise das cepas de *Streptococcus pneumoniae* causadores de pneumonia invasiva: sorotipos e sensibilidade aos antimicrobianos. **J. pediatr.** Rio de Janeiro; 87:70-75, 2011.

YUSTE, J.; BOTTO, M.; PATON, J. C.; HOLDEN, D. W.; BROWN, J. S. Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. **J. Immunol**, 175:1813–1819, 2005.



# **ANEXOS**



UNIVERSIDADE SÃO  
FRANCISCO-SP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do potencial opsonizante da lactoferrina sobre Streptococcus pneumoniae

**Pesquisador:** Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini

**Área Temática:**

**Versão:**

**CAAE:** 31304014.6.0000.5514

**Instituição Proponente:** Universidade São Francisco-SP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 667.926

**Data da Relatoria:** 29/05/2014

#### **Apresentação do Projeto:**

O presente trabalho propõe uma análise da interação entre lactoferrina e pneumococos, e da amplitude dos efeitos desta interação. Inicialmente, será avaliada a interação entre lactoferrina e pneumococos contendo PspAs distintas e sorotipos diversos por citometria de fluxo. A seguir, será investigado o efeito da lactoferrina sobre a opsonofagocitose de pneumococos selvagens e mutantes PspA-negativos por leucócitos humanos e murinos in vitro.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar o potencial da lactoferrina em aumentar a fagocitose de S. pneumoniae in vitro.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A coleta de 20 ml de sangue por punção venosa periférica feita por profissional qualificado não expõem o voluntário a riscos. Não há benefícios diretos aos voluntários.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de estudo in vitro que utilizará células brancas do sangue (neutrófilos) em ensaios in vitro.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE apresentado precisa constar que não há benefícios aos voluntários.

**Endereço:** SAO FRANCISCO DE ASSIS 218

**Bairro:** JARDIM SAO JOSE

**CEP:** 12.916-900

**UF:** SP

**Município:** BRAGANCA PAULISTA

**Telefone:** (11)2454-8981

**Fax:** (11)4034-1825

**E-mail:** comite.etica@saofrancisco.edu.br



Continuação do Parecer: 667.926

**Recomendações:**

Adequar TCLE.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto aprovado com a sugestão que seja incluso no TCLE a informação sobre Benefícios, como por exemplo: "A participação neste estudo não lhe acarretará nenhum benefício terapêutico".

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

APÓS DISCUSSÃO EM REUNIÃO DO DIA 29/05/2014, O COLEGIADO DELIBEROU PELA APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISAS.

BRAGANCA PAULISTA, 30 de Maio de 2014

---

Assinado por:  
**MARCELO LIMA RIBEIRO**  
(Coordenador)

Endereço: SAO FRANCISCO DE ASSIS 218

Bairro: JARDIM SAO JOSE

CEP: 12.916-900

UF: SP

Município: BRAGANCA PAULISTA

Telefone: (11)2454-8981

Fax: (11)4034-1825

E-mail: comite.etica@saofrancisco.edu.br



**COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL EM PESQUISA - CEUA**

Bragança Paulista, 25 de Setembro de 2014

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**Projeto de Pesquisa:** Avaliação do potencial opsonizante da lactoferrina sobre Streptococcus pneumoniae.

**ÁREA DE CONHECIMENTO:** Saúde e Biológicas

**Autor(es):** Profa. Dra. Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini

**Instituição:** UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

**Protocolo:** 002.09.2014

**IP. CIUCA:** 200.225.122.34

Prezado(a)(s) Pesquisador(a)(s),

O Comitê de Ética em Pesquisa com Uso de Animais de Pesquisa- CEUA, da Universidade São Francisco, analisou em reunião ordinária no dia 25/09/2014 o projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade de Vossa Senhoria.

Este Comitê, acatando o parecer do relator indicado, apresenta-lhe o seguinte resultado:

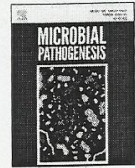
**Parecer:** Aprovado

**Alessandra Gambero**

**Vice-Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animal em Pesquisa  
Universidade São Francisco**

Campus Bragança Paulista  
Campus Campinas - Unidade Cambuí  
Campus Campinas - Unidade Swift  
Campus Itatiba  
Campus São Paulo

Av. São Francisco de Assis, 218 - Jd. São José - CEP 12916-900 / Tel.: 11 2454.8000 / Fax: 4034.1825  
R. Cel. Silva Teles, 700 prédio C - Cambuí - CEP 13024-001 / Tel.: 19 3779.3370  
R. Waldemar César da Silveira, 105 - Swift - CEP 13045-510 / Tel.: 19 3779.3300 / Fax: 3779.3321  
R. Alexandre Rodrigues Barbosa, 45 - Centro - CEP 13251-900 / Tel.: 11 4534.8000 / Fax: 4534.8015  
R. Antonieta Leitão, 129 - Freguesia do Ó - CEP 02925-160 / Tel.: 11 3411.2950 / Fax: 3411.2978



## Combined effects of lactoferrin and lysozyme on *Streptococcus pneumoniae* killing



G.O. André<sup>a</sup>, W.R. Politano<sup>a</sup>, S. Mirza<sup>b</sup>, T.R. Converso<sup>c,d</sup>, L.F.C. Ferraz<sup>a</sup>, L.C.C. Leite<sup>d</sup>, M. Darrieux<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Farmacologia, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, Brazil

<sup>b</sup> Division of Epidemiology, University of Texas Health Science Center at Houston, USA

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia-USP-IPT-IB, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 November 2014

Received in revised form

13 August 2015

Accepted 18 August 2015

Available online 20 August 2015

#### Keywords:

*Streptococcus pneumoniae*

Lactoferrin

Lysozyme

PspA

### ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae* is a common colonizer of the human nasopharynx, which can occasionally spread to sterile sites, causing diseases such as otitis media, sinusitis, pneumonia, meningitis and bacteremia. Human apolactoferrin (ALF) and lysozyme (LZ) are two important components of the mucosal innate immune system, exhibiting lytic effects against a wide range of microorganisms. Since they are found in similar niches of the host, it has been proposed that ALF and LZ could act synergistically in controlling bacterial spread throughout the mucosa. The combination of ALF and LZ has been shown to enhance killing of different pathogens *in vitro*, with ALF facilitating the latter action of LZ. The aim of the present work was to investigate the combined effects of ALF and LZ on *S. pneumoniae*. Concomitant addition of ALF and LZ had a synergistic killing effect on one of the pneumococci tested. Furthermore, the combination of ALF and LZ was more bactericidal than lysozyme alone in all pneumococcal strains. Pneumococcal surface protein A (PspA), an important vaccine candidate, partially protects pneumococci from ALF mediated killing, while antibodies against one PspA enhance killing of the homologous strain by ALF. However, the serological variability of this molecule could limit the effect of anti-PspA antibodies on different pneumococci. Therefore, we investigated the ability of anti-PspA antibodies to increase ALF-mediated killing of strains that express different PspAs, and found that antisera to the N-terminal region of PspA were able to increase pneumococcal lysis by ALF, independently of the sequence similarities between the molecule expressed on the bacterial surface and that used to produce the antibodies. LF binding to the pneumococcal surface was confirmed by flow cytometry, and found to be inhibited in presence of anti-PspA antibodies. On a whole, the results suggest a contribution of ALF and LZ to pneumococcal clearance, and confirm PspA's ability to interact with ALF.

© 2015 Published by Elsevier Ltd.

### 1. Introduction

Antimicrobial proteins are essential components of the innate immune system, exhibiting several mechanisms of defense against a wide spectrum of pathogens. These molecules are produced in large amounts in all secretory fluids, as the first line of protection from mucosal pathogens [1]. Two of the major antimicrobial proteins are lactoferrin and lysozyme [2].

Human lactoferrin (hLF) is a mucosal glycoprotein, present in

high concentrations in milk (from 1 to 7 g/L) [3], and also found in secretions such as saliva, tear, semen and neutrophil granules. It is a multifunctional protein, displaying immunomodulatory effects [3,4], bacteriostatic and antimicrobial activities against a wide variety of pathogens, including fungi, bacteria, viruses and parasites [5]. The bacteriostatic effect of hLF is due to its ability to sequester iron, an essential component for bacterial growth. The lytic action of hLF, on the other hand, is related to the iron free (apolactoferrin-ALF) form of the molecule, which can undergo proteolysis and produce cationic peptides (lactoferricins-LFN) that destabilize microbial membranes [6,7]. The mechanism of action of lactoferricins in Gram-negative bacteria involves the release of lipopolysaccharide, leading to an increase in the permeability of the outer

\* Corresponding author.

E-mail address: [michelle.bertoncini@saofrancisco.edu.br](mailto:michelle.bertoncini@saofrancisco.edu.br) (M. Darrieux).