

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mecanismos bioquímicos de ação da Toxina Colérica

Similarmente a certas linhagens de *Escherichia coli*, a bactéria *Vibrio cholerae* coloniza o intestino do hospedeiro e produz uma grande desordem intestinal, desencadeando um quadro clínico conhecido como cólera. Esta doença tem como principal sintoma, diarreia profusa, que pode causar a morte do indivíduo infectado em poucos dias por desidratação, pela ação de uma proteína chamada Toxina colérica (CT) (Holmgren, 1981; Voet & Voet, 1995).

CT é uma proteína de massa molecular 85 kDa, composta por uma subunidade A (CTA) (27 kDa) e cinco subunidades B (CTB) (11,6 kDa cada), que formam uma estrutura tridimensional do tipo AB₅ (Holmgren, 1981) (Figura 1B). CTA é em grande parte responsável pela atividade tóxica e é composta por dois polipeptídios, A₁ com 22 kDa e A₂ com 5 kDa, ligados por uma ponte dissulfeto. CTB, a porção não tóxica, responsável pela ligação aos receptores celulares (gangliosídeos GM1), é composta por 5 peptídeos idênticos ligados não-covalentemente e organizados em um anel pentamérico (Figura 1A). Cada monômero da subunidade B possui 103 resíduos de aminoácidos e contém uma ligação dissulfeto intramolecular entre Cys⁹ e Cys⁸⁶ (L'hoir, 1990; Mekalanos, 1983). O poro de CTB é rico em aminoácidos com caráter hidrofóbico e, a interação destes resíduos com a subunidade A₂ mantém a estrutura da toxina (Tinker e colaboradores, 2003). A porção C-terminal do fragmento A₂ forma um segmento estendido que se insere no poro central do pentâmero B₅. O segmento N-terminal de A₂ forma uma α -hélice que se estende além do pentâmero B₅, como que amarrasse o fragmento A₁ (em forma de cunha) a B₅, (Voet & Voet, 1995) (Figura 1B).

Cada subunidade B pentamérica se liga com alta afinidade a um receptor constitutivamente expresso na superfície de células eucarióticas, o gangliosídeo GM1 (Figura 2), principalmente através da galactose terminal (Lencer e Tsai, 2003; Mekalanos, 1983). GM1 é um glicolípido

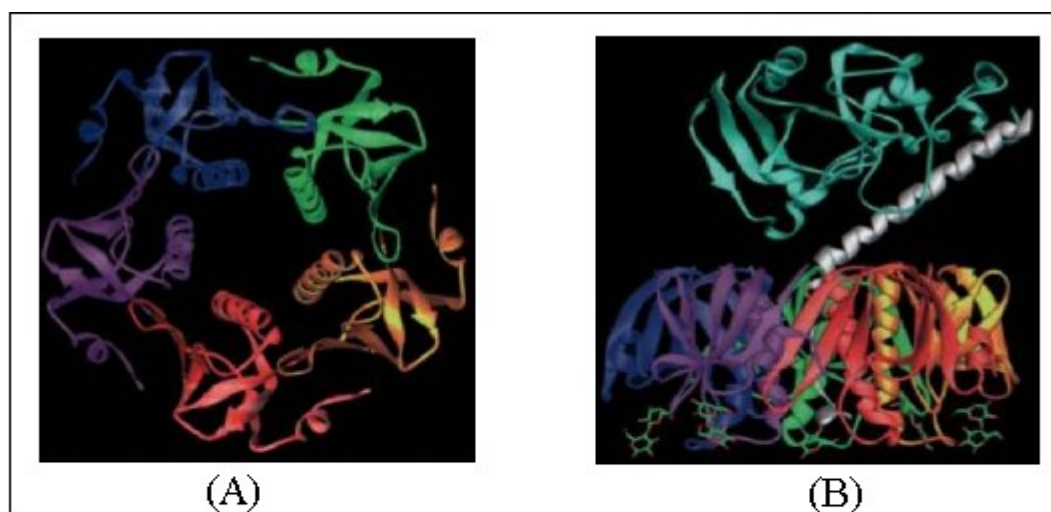


Figura 1: Estrutura de raios-X da Toxina Colérica (CT) ou da Toxina Lábil de *E. coli* (LT). A) Um diagrama de fitas do pentâmero B₅ visto ao longo dos seus eixos quintuplos de simetria. Cada subunidade está representada por uma cor diferente. Por este diagrama é possível ver o poro central do pentâmero. B) Um diagrama de fitas do complexo inteiro visto perpendicularmente em relação à parte A). O segmento A₂ está representado em branco e A₁, em azul esverdeado, e as subunidades B estão coloridas como na parte A). Moléculas de lactose encontram-se ligadas à subunidade B pentamérica. Esta figura foi retirada de Voet & Voet, 1995.

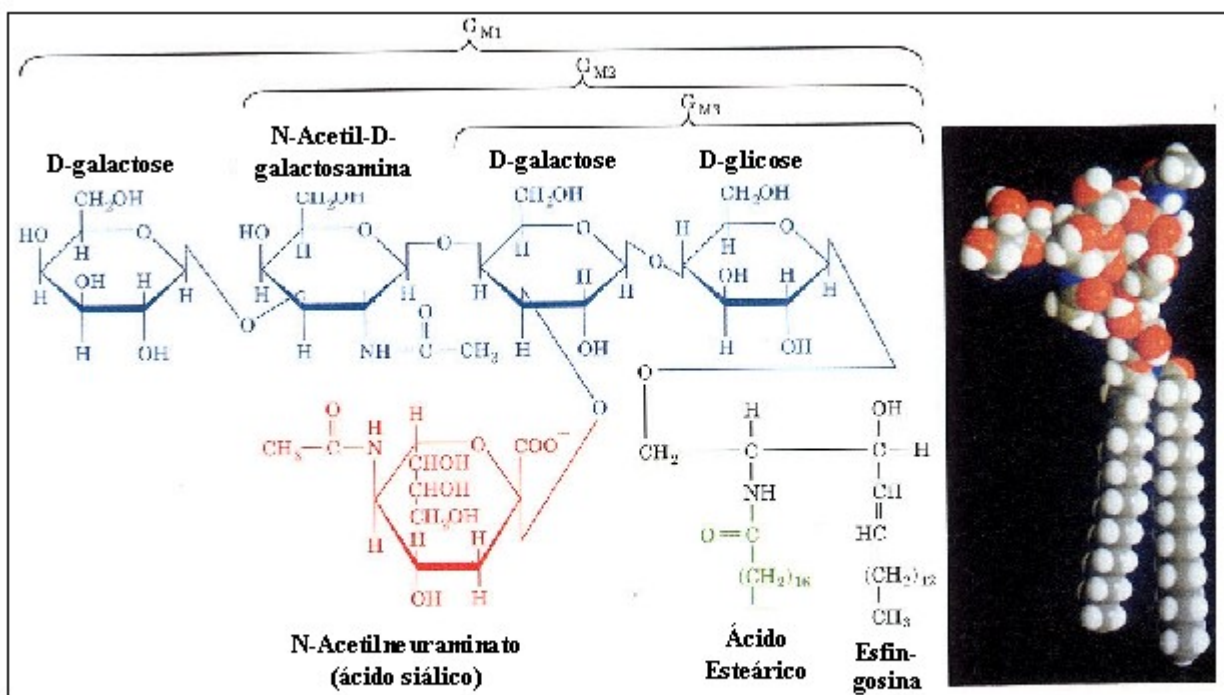


Figura 2: Estrutura dos receptores celulares monosialogangliosídicos GM1, GM2 e GM3. Esta figura foi adaptada de Voet & Voet, 1995.

encontrado geralmente em cavéolas, estruturas organizadas de membrana, enriquecidas em glicolipídeos, colesterol e em caveolina, envolvidas em endocitose e transcitose, transporte celular e transdução de sinal (Shin e colaboradores, 2001). Estas estruturas de membrana estão presentes em diversos tipos de células, inclusive do sistema imune, como mastócitos (Shin e colaboradores, 2000) e células T (Thomas e colaboradores, 2004). A alta afinidade de CTB por este gangliosídeo foi relacionada inicialmente à presença de 40 resíduos de aminoácidos na extremidade N-terminal da proteína, também encontrados num segmento interno de diversos hormônios glicoprotéicos, como gonadotrofinas e tirotrofinas, ligantes naturais de GM1 (Kurosky e colaboradores, 1977). Entretanto, trabalhos recentes mostraram que os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação de CTB a GM1 estão espalhados por toda a molécula protéica (Jobling e Holmes, 2002; Bäckström e colaboradores, 1997), conforme representado na figura 3.

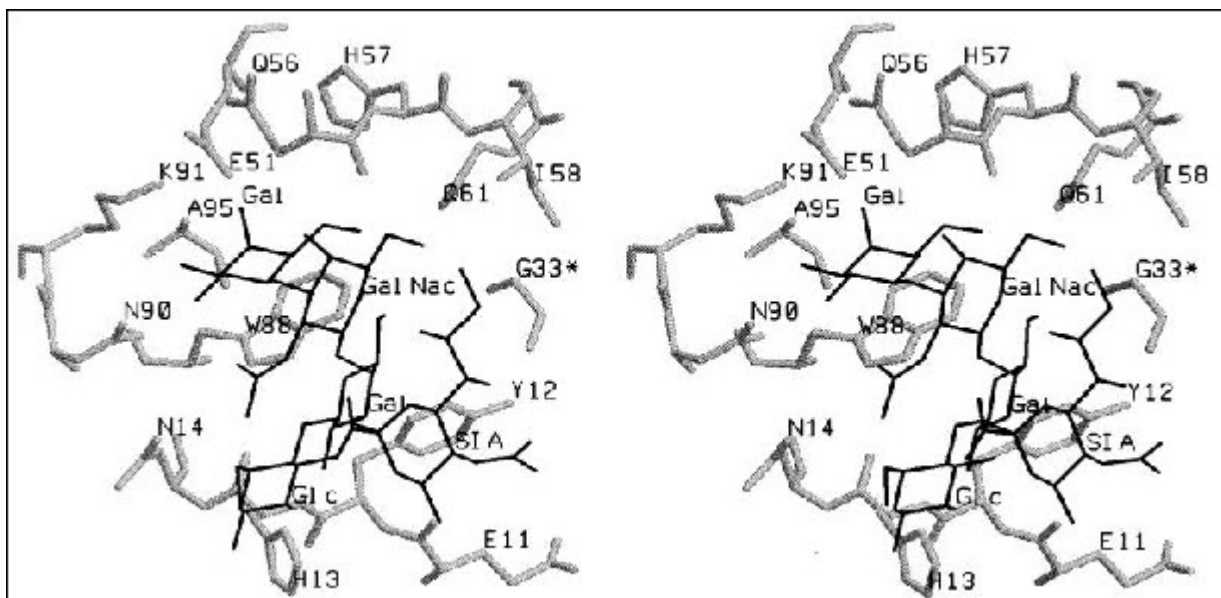


Figura 3: Estéreo-representação dos resíduos de CTB envolvidos na interação com GM1. A porção oligossacarídica de GM1 está mostrada em preto, e os açúcares estão identificados [Gal-GalNac-Gal-(SAI)-Glc]. Resíduos de CTB de um monômero estão mostrados em cinza. G33* mostra uma contribuição do monômero adjacente na ligação a GM1. Esta figura foi retirada de Jobling e Holmes, 2002.

Após a secreção de CT através da membrana externa de *Vibrio cholerae*, a subunidade A sofre uma clivagem proteolítica na posição R192 por uma protease, que também é secretada pela bactéria (Mekalanos e colaboradores, 1979). A clivagem neste aminoácido, localizado numa alça exposta que se estende do resíduo C187 ao C199, é essencial para que a ponte dissulfeto que une os domínios A1 e A2 seja desfeita, etapa realizada dentro da célula do hospedeiro (Lencer e Tsai, 2003; Tsai e colaboradores, 2001). Após ligação da toxina ao receptor celular GM1, CT é levada para dentro das células intestinais humanas, possivelmente via endocitose mediada pelo receptor. A toxina segue por transporte retrógrado até o Retículo Endoplasmático (ER), onde é desmontada e o domínio A1 é secretado no citosol (Tsai e colaboradores, 2001). Uma vez no citosol, A₁ catalisa a transferência de uma unidade ADP-ribose do agente oxidante NAD⁺ para um resíduo de arginina de proteínas G_s, que são as mediadoras da sinalização celular após a ligação do hormônio ao receptor, promovendo a ativação da adenilato ciclase. Esta modificação covalente provoca a perda da atividade GTPásica (capacidade de converter GTP para GDP) da proteína G_s, que permanece ligada a GTP, mantendo ativada a adenilato ciclase mesmo na ausência do hormônio. Desta forma, são produzidas quantidades cada vez maiores de adenosina monofosfato cíclica (cAMP). Um aumento de mais de 100 vezes na concentração de cAMP nas células da mucosa intestinal provoca a abertura de canais de Cl⁻ na membrana celular, resultando em grande afluxo destes íons e água para a “luz” intestinal, ocasionando a forte diarreia característica de cólera (Voet & Voet, 1995; Mekalanos, 1983). A Toxina Colérica pertence à classe das holotoxinas, da qual fazem parte a toxina lábil de *E. coli* (LT) e a toxina pertussis (PT) (Voet & Voet, 1995).

1.2. CT como imunógeno e adjuvante de mucosas

A maioria das doenças infecciosas afeta diretamente ou são adquiridas através de sítios de mucosa. Para muitos organismos, a colonização dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital é a primeira etapa na patogênese. Estas infecções ainda representam um enorme desafio no

desenvolvimento de vacinas que sejam capazes de prevenir as etapas de adesão e colonização do epitélio da mucosa (para bactérias não-invasivas), de penetração e replicação na mucosa (para vírus e bactérias invasivas) e/ou o bloqueio da ligação e ação de toxinas microbianas (Holmgren e colaboradores, 2003). Vários autores têm relacionado a proteção de infecções de mucosa à produção de Imunoglobulina A secretória (S-IgA) (Lycke e Holmgren, 1986; Elson e Ealding, 1984). A geração de anticorpos específicos de isotipo IgA secretórios geralmente requer a estimulação de sítios indutivos especializados do sistema imune de mucosa (MALT). Nos últimos anos, estratégias efetivas para imunização nesses sítios de mucosa têm sido desenvolvidas em detrimento da vacinação convencional por via parenteral (Wu e colaboradores, 1997). Este tipo de abordagem ativa preferencialmente uma resposta antígeno-específica de anticorpos, mediada por células T auxiliaadoras do tipo 2 (Th2) CD4+, que secretam citocinas específicas, interleucinas 4, 5 e 10, que estimulam as células B a produzirem anticorpos de isotipo IgG1 (em camundongos), IgE e S-IgA. Entretanto, em alguns casos, a imunização de mucosa pode resultar num caráter misto Th2 e Th1, sendo este último caracterizado pela mediação da imunidade celular pela secreção de interferon- γ (IFN- γ) e produção de IgG2a (em camundongos) (Abbas e colaboradores, 1996).

As superfícies de mucosa, além de serem consideradas as principais portas de entrada de patógenos, são as porções do corpo mais expostas a uma grande quantidade de antígenos estranhos benignos, adquiridos através de alimentos, do ar e de outras formas. Estas substâncias são ignoradas pelo sistema imune, através de uma complexa regulação de tolerância imunológica, e por este motivo, apenas poucas moléculas são imunogênicas nestes sítios indutivos (Rappuoli e colaboradores, 1999). Dados da literatura mostram que pacientes recuperados apresentam títulos detectáveis de IgG anti-CT no soro por anos após o episódio de cólera (Spangler, 1992). Além disso, vários trabalhos mostram o potencial de CT como imunógeno por via oral em diversas espécies incluindo camundongos (Elson e Ealding, 1984), ratos (Pierce, 1978), cachorros (Pierce e colaboradores, 1980), porcos (Foss e Murtaugh, 1999) e primatas (Kubota e colaboradores, 1997).

Além de CT e LT serem os melhores imunógenos de mucosa caracterizados até o momento, tanto em humanos quanto em modelos animais, a resposta antitoxina é tão potente que, uma resposta imune também é ativada contra antígenos estranhos que estejam presentes simultaneamente na superfície da mucosa (Rappuoli e colaboradores, 1999). Como consequência deste efeito, estas moléculas têm sido extensivamente estudadas como imunógenos e adjuvantes de mucosa em modelos animais.

O efeito adjuvante das toxinas CT e LT na forma co-administrada com antígenos, primeiramente descrito por Elson e Ealding (1984), tem sido caracterizado em diversos sistemas e modelos animais, e por várias vias de imunização (Gopal e colaboradores, 2005; Harada e colaboradores, 2002; Arakawa e colaboradores, 2003). Além dos efeitos imuno-estimulatórios de CT na forma co-administrada a proteínas solúveis, esta toxina é capaz de agir como adjuvante para vacinas baseadas em bactérias mortas (Malley e colaboradores, 2001). Em todos os casos, foi observada produção de anticorpos IgG e IgA antígeno-específicos no soro e nas secreções de mucosa e, em alguns casos, proteção. Dados da literatura mostram que pelo menos parte do efeito adjuvante de CT se relaciona à capacidade de induzir a secreção de citocinas inflamatórias como interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 12 (IL-12), e interferon-gama (IFN- γ) (Murtaugh e Foss, 2002; Leal-Berumen e colaboradores, 1996). Estas moléculas são essenciais na resposta imune inata do hospedeiro e indução de uma resposta imune adaptativa protetora. Em adição a isto, CT é capaz de induzir memória imunológica através da manutenção de células B produzindo IgM antígeno-específica com baixa avidéz na medula óssea (Soenawan e colaboradores, 2004). Células B de memória, após re-exposição ao antígeno, sofrem mudança de isotipo de imunoglobulinas produzidas de IgM para IgG ou IgA e afinidade de maturação, através de extensiva proliferação e seleção de clones de alta afinidade em centros germinativos, como a medula óssea (Rajewsky, 1996).

Vários autores tentaram relacionar estes efeitos imuno-regulatórios descritos para CT e LT à presença da subunidade A enzimaticamente ativa, ou seja, capaz de promover acúmulo de cAMP nas células (Bagley e colaboradores, 2003; Cheng e colaboradores, 2000; Lycke e colaboradores, 1991). Embora todos estes trabalhos mostrem a importância da subunidade A ativa para a observação dos efeitos imuno-regulatórios por via oral, De Haan e colaboradores (1998) mostraram que por via intranasal, tanto a imunogenicidade quanto o efeito adjuvante não parecem estar diretamente relacionados à atividade catalítica das toxinas. Estes resultados são confirmados pelo uso dos mutantes CT-E112K (Ohmura e colaboradores, 2002) e LT-K63S (Jakobsen e colaboradores, 2002), sem atividade catalítica, como adjuvantes por via intranasal.

1.3. CTB como imunógeno e adjuvante de mucosas na forma co-administrada a antígenos

Embora as toxinas CT e LT sejam descritas como excelentes imunógenos e adjuvantes de mucosa, o uso destas proteínas em humanos não é permitido. Desta forma, formulações não-tóxicas baseadas em CTB têm sido testadas em humanos e em modelos animais. Neste sentido, imunização intranasal de mulheres com CTB recombinante, produzida em linhagens mutantes de *Vibrio cholerae* que não expressam CTA, resultou em anticorpos IgG e IgA anti-CTB no soro, nas secreções nasais e vaginais de maneira dose-dependente e de longa duração (Bergquist e colaboradores, 1997). Isto mostra o potencial de CTB em induzir resposta no sítio de mucosa no qual a proteína foi administrada e em sítios remotos, como o trato genital. Da mesma forma, CTB recombinante tem sido utilizada com sucesso como adjuvante de mucosa, principalmente na forma co-administrada a vacinas celulares para uso em humanos, como a própria vacina de cólera (Karlsen e colaboradores, 2003; Rudin e colaboradores, 1999 e 1998; Holmgren e colaboradores, 1994; Quiding e colaboradores, 1991) e para diarreia causada por ETEC (Qadri e colaboradores, 2000). Analogamente, CTB se mostrou bom adjuvante em camundongos, para uma vacina celular de *Streptococcus pneumoniae*, por via intranasal (Malley e colaboradores, 2004), e para o vírus

inativado SARS-CoV (do inglês severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus) (Qu e colaboradores, 2005). Adicionalmente, um trabalho que expressa CTB em BCG mostra a produção de anticorpos anti-BCG e o efeito adjuvante a ovalbumina (OVA), mesmo quando o antígeno e o adjuvante são administrados simultaneamente por vias diferentes de imunização (Biet e colaboradores, 2003). Em vista do potencial de CTB como regulador da resposta imune, esta subunidade tem sido produzida em diversos sistemas bacterianos como *Escherichia coli* (L'hoir e colaboradores, 1990), *Bacillus brevis* (Goto e colaboradores, 2000), *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* (Slos e colaboradores, 1998) ou levedura *Hansenula polymorpha* (Song e colaboradores, 2004).

Outros exemplos da ação adjuvante de CTB, na forma co-administrada, têm sido descritos, em camundongos (Wang e colaboradores, 2003 (b); Isaka e colaboradores, 2001; Isaka e colaboradores, 1999; Pascale e colaboradores, 1999) e raposas (Rolland-Turner e colaboradores, 2004). Diferentes formulações, como encapsulamento em lipossomas ou microesferas com antígenos (Seo e colaboradores, 2002; Seong e colaboradores, 1999) ou conjugada com vesículas ou lipossomas contendo antígenos (Lian e colaboradores, 2000; Harokopakis e colaboradores, 1998) também foram testadas com sucesso. Aparentemente, o efeito adjuvante de CTB na forma co-administrada, principalmente por via oral, parece estar estreitamente relacionado à natureza do antígeno.

1.4. CTB como adjuvante de mucosas ou indutor de tolerância na forma fusionada ou quimicamente conjugada a antígenos heterólogos

Uma vez que CTB é um adjuvante de mucosas menos potente que CT na forma co-administrada, possivelmente pela entrada menos eficiente do antígeno nas células, alguns grupos têm testado construções baseadas em CTB e antígenos heterólogos fusionados ou quimicamente conjugados. Em geral, estas moléculas híbridas são compostas por antígenos fusionados às

extremidades N- ou C- terminais de CTB (Liljeqvist e colaboradores, 1997), ou num sítio permissivo de inserção entre os resíduos 55 e 64 da subunidade, que aparentemente não possuem um papel importante na ligação a GM1 (Bäckström e colaboradores, 1995). Diversos efeitos têm sido descritos para as fusões de CTB a antígenos, como efeito adjuvante e efeito tolerogênico. A imunização de animais, com fusões de CTB a auto-antígenos, resulta na prevenção e reversão de doenças auto-imunes em modelos de esclerose múltipla por via oral (Sun e colaboradores, 1996) e, diabetes por via oral (Ploix e colaboradores, 1999) ou intranasal (Aspord e Thivolet, 2002). Além disso, CTB também diminui a resposta pró-inflamatória de macrófagos a LPS (Burkart e colaboradores, 2002). Aparentemente, estes efeitos de indução de tolerância a antígenos heterólogos, por via de mucosa também são compartilhados por LTB (Tamura e colaboradores, 1997). De uma maneira geral, as citocinas TGF- β 1 (do inglês Transforming growth factor β 1) e IL-10, secretadas por células T de mucosa e células epiteliais, induzidas pela imunização com construções baseadas em CTB, são descritas como mediadoras tanto do processo de tolerância quanto da produção de S-IgA (Mestecky e colaboradores, 2005; Kim e colaboradores, 1998). Provavelmente, outros fatores definem o padrão de resposta como tolerogênica ou humoral com anticorpos S-IgA.

Como mencionado anteriormente, além dos estudos relacionados a modelos de tolerância, muitos trabalhos mostram a indução de resposta imune através de imunização de camundongos com CTB conjugada ou fusionada a polissacarídeos (Shen e colaboradores, 2001), ou a antígenos solúveis (Kim e colaboradores, 2004; Kang e colaboradores, 2003; Lee e colaboradores, 2003; Tsuji e colaboradores, 2003; Lebens e colaboradores, 2003; Naz e Chauhan, 2002; Larsson e colaboradores, 2002; Sun e colaboradores, 1999; Cano e colaboradores, 1999; Lebens e colaboradores, 1996; Zhang e colaboradores, 1995). Em todos os casos, houve indução de anticorpos IgG e IgA antígeno-específicos e, em alguns casos, proteção. Este efeito adjuvante de CTB, na forma fusionada ou conjugada quimicamente a antígenos heterólogos, foi relacionado à

maior eficiência na apresentação de antígeno (George-Chandy e colaboradores, 2001) e estímulo da secreção de IL-1 por células dendríticas (Eriksson e colaboradores, 2003). Além disso, CTB é capaz de ativar o metabolismo de ácido araquidônico, o precursor das prostaglandinas (Peterson e colaboradores, 1999).

1.5. CT, LT, CTB e mutantes das toxinas como adjuvantes por vias de pele

Além das vias de mucosa, CT, LT, CTB, e mutantes das toxinas têm sido utilizados como imunógenos ou adjuvantes na forma co-administrada por via de pele, através de imunização de camundongos por via epidérmica (Chen e colaboradores, 2002), transcutânea (Partidos e colaboradores, 2004; Anjuère e colaboradores, 2003; Yu e colaboradores, 2002; Scharon-Kersten e colaboradores, 1999; Glenn e colaboradores, 1999) ou subcutânea (Isaka e colaboradores, 1999; Asanuma e colaboradores, 1995). A pele é um sítio imunologicamente ativo que compreende diversos tipos de células, como mastócitos, queratinócitos e células de Langerhans (células dendríticas da pele), que compõem o sistema linfóide associado à pele (SALT). Pela alta acessibilidade da pele e o fato desta constituir um sítio imunologicamente ativo, esta via tem se mostrado promissora para a administração de vacinas (Partidos *et al.*, 2004). Este tipo de imunização pode gerar uma resposta predominantemente Th1, resposta requerida para bactérias invasivas e intracelulares, por exemplo. Adicionalmente, CT e CTB também foram descritas como bons adjuvantes por via intraperitoneal (Park e colaboradores, 2003). No presente trabalho, o potencial adjuvante de CTB foi avaliado em fusão com dois antígenos de *Streptococcus pneumoniae* por via de mucosa (intranasal) e de pele (intradérmica)

1.6. Microbiologia de *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae (pneumococo) é uma bactéria Gram-positiva, cuja parede celular é coberta por uma cápsula polissacarídica de composição variável, responsável pela diferenciação sorológica

entre os 90 tipos existentes, dentre os quais somente alguns causam doenças (WHO position paper, 1999). *S. pneumoniae* é parte da flora comensal transitória do trato respiratório superior juntamente com *Moraxella cattarralis*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* e vários outros estreptococos hemolíticos (Bogaert e colaboradores, 2004). O balanço destas bactérias na mucosa é obtido através da produção de H_2O_2 pelo metabolismo do pneumococo em condições aeróbicas, que resulta na inibição de crescimento das outras bactérias transitoriamente residentes no nicho nasofaríngeo (Pericone e colaboradores, 2000). O próprio pneumococo é sensível a H_2O_2 , mas a bactéria possui mecanismos de lise das hemácias e, subsequente utilização da catalase do hospedeiro. Embora a colonização da nasofaringe por *S. pneumoniae* seja um processo assintomático, a partir deste sítio, a bactéria pode infectar outros indivíduos, através de aerosol e troca de muco, ou migrar para outros sítios de forma a causar doenças respiratórias ou sistêmicas (Bogaert e colaboradores, 2004), conforme visualizado na figura 4.

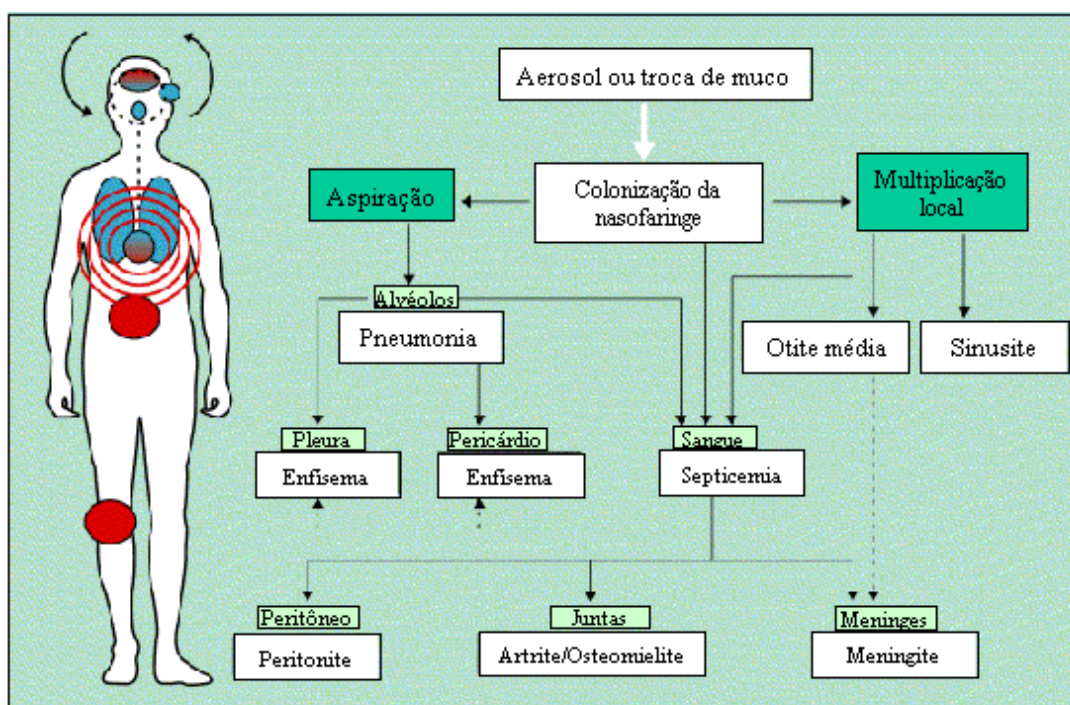


Figura 4: Rota patogênica de infecção por *S. pneumoniae*. Órgãos infectados através das vias aéreas e da corrente sanguínea estão indicados em azul e vermelho, respectivamente. Esta figura foi adaptada de Bogaert e colaboradores, 2004.

O diagnóstico laboratorial deste microorganismo é feito através da coloração de Gram em esfregaços provenientes do muco nasal, seguida pela incubação com anticorpos anti-capsulares, conhecida como reação de Quellung. Adicionalmente, em placas de ágar-sangue, as bactérias formam pequenas colônias α -hemolíticas, que ao contrário de outros estreptococos são solúveis em bile e sensíveis a etil-hidrocupreína (optoquina) (Levinson & Jawetz, 1998). Os fatores que aumentam a susceptibilidade de indivíduos a infecções pneumocócicas incluem: intoxicação por álcool, drogas, ou outras deteriorações cerebrais que possam deprimir o reflexo da tosse e aumentar a aspiração de secreções; anormalidades do trato respiratório, como infecções virais; acúmulo de muco, obstrução dos brônquios e injúrias no trato respiratório causados por substâncias que perturbam a integridade e o movimento da camada mucociliar; dinâmica circulatória anormal, como congestão pulmonar e falha cardíaca; esplenectomia; deficiências congênitas ou adquiridas do sistema imune e determinadas doenças crônicas como a anemia falciforme e a nefrose (Levinson & Jawetz, 1998). Além disso, modelos animais mostram que o tratamento crônico com morfina aumenta a susceptibilidade a infecções pneumocócicas, pela depleção de alguns fatores envolvidos na resposta imune inata (Wang e colaboradores, 2005).

1.7. *Streptococcus pneumoniae* como agente etiológico e medidas profiláticas

Streptococcus pneumoniae é a mais importante causa de pneumonia, meningite, e otite média, provocada por bactéria, em crianças, adultos e em pacientes com doenças crônicas, principalmente imunossupressoras, como AIDS. Infecções por *S. pneumoniae* representam a quinta maior causa de morte no mundo, principalmente em crianças com menos de 5 anos (Kadioglu e Andrew, 2004). Além disso, cerca de 40-50% dos isolados da Europa Ocidental, África do Sul, América do Sul, Nova Guiné e Coréia do Sul são resistentes à penicilina, resultando em grande dificuldade no tratamento de infecções provocadas por este patógeno (Kadioglu e Andrew, 2004). A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência de *S. pneumoniae* (Hava e colaboradores,

2003), e anticorpos dirigidos à cápsula são capazes de proteger animais imunizados de desafios com linhagens de sorotipos homotípicos (Saeland e colaboradores, 2000). Com base nisto, grandes investimentos têm sido feitos no uso das cápsulas polissacarídicas na profilaxia de doenças pneumocócicas. A primeira vacina lançada no mercado, a Pneumovax 23 (Merck Sharp Dohme®), é composta por 23 polissacarídeos capsulares dos sorotipos prevalentes nos EUA e Europa. Embora esta vacina para *S. pneumoniae* esteja sendo utilizada há mais de 10 anos, sua eficácia é alta somente em adultos saudáveis, e tem pouco efeito em crianças muito jovens (com menos de 2 anos), em pacientes com imunodeficiências, como os HIV positivos, e idosos. Além disso, a vacina produz uma resposta timo-independente e desta forma, não gera memória imunológica (WHO position paper, 1999). Para melhorar a eficiência da vacina polissacarídica, a nova geração de vacinas em teste consiste em 7-11 polissacarídeos dos sorotipos prevalentes nos EUA e Europa, conjugados quimicamente a um toxóide bacteriano carreador, o CRM-197 (Toxina Diftérica mutada e inativada) ou toxóide tetânico (TT). Estas vacinas são capazes de proteger crianças e adultos de doenças invasivas e diminuem a carga bacteriana na nasofaringe. Além disso, produzem uma resposta timo-dependente que pode gerar clones de células de memória. Entretanto, além dos altos custos de produção, há uma possibilidade de que o uso destas vacinas conjugadas provoque a substituição dos sorotipos prevalentes por aqueles não incluídos na formulação (WHO position paper, 1999). Este efeito já foi observado em testes clínicos em casos de otite média (Veenhoven e colaboradores, 2003). O trabalho mostrou completa substituição dos sorotipos, havendo ocorrência de otite causada por aqueles não incluídos na formulação da vacina conjugada. Além do problema de substituição dos sorotipos causadores de doença observados após imunização com a vacina conjugada 7-valente Prevnar (Wyeth, USA), a cobertura dos sorotipos prevalentes no Brasil, por exemplo, é relativamente baixa, aproximadamente 60% (Brandileone e colaboradores, 2003). Desta forma, outras alternativas de formulação de uma vacina antipneumocócica devem ser investigadas.

1.8. Proteínas de superfície de *Streptococcus pneumoniae*

O uso de proteínas pneumocócicas conservadas, presentes na superfície do patógeno (Figura 5), parece ser uma boa estratégia de vacinação contra *S. pneumoniae*, uma vez que podem conferir resposta timo-dependente, induzir clones de células de memória e proteger o hospedeiro da infecção por pneumococo de qualquer sorotipo capsular. Várias proteínas de pneumococos são conhecidas por suscitar imunidade protetora. Uma delas é PsaA (do inglês Pneumococcal surface adhesin A), uma lipoproteína altamente conservada nos 90 sorotipos capsulares (Morrison e colaboradores, 2000), primeiramente descrita por Russel e colaboradores (1990). Esta proteína é produto de um gene pertencente a um operon ABC que, supostamente, está envolvido no transporte de manganês e zinco, processo dirigido pela hidrólise de ATP, dentro da bactéria (Dintilhac e colaboradores, 1997). PsaA foi inicialmente descrita como uma adesina (Berry e Paton, 1996), uma vez que mutantes de pneumococo PsaA⁻ não possuem qualquer inibição no crescimento *in vitro*, mas são avirulentos em camundongos (Rigden e colaboradores, 2003; Tseng e colaboradores, 2002; Jedrzejak, 2001). Este efeito foi relacionado, por alguns autores, à ligação de PsaA a N-acetilglicosamina na célula do hospedeiro (Bogaert e colaboradores, 2004), e por outros à modulação da expressão de adesinas como CbpA (do inglês Choline-binding protein A) na presença de Mn²⁺ ou Zn²⁺ (Jedrzejak, 2001). Adicionalmente, mutantes de pneumococo PsaA⁻ são mais sensíveis a estresse oxidativo, gerado por radicais superóxido provenientes da reação de Fe²⁺ com H₂O₂ (reação de Fenton), subproduto do metabolismo aeróbico da bactéria. Apesar de *S. pneumoniae* não possuir catalase, a bactéria possui uma superóxido dismutase que usa Mn²⁺ como cofator (Johnston e colaboradores, 2004; Tseng e colaboradores, 2002).

Vários autores relatam a oclusão de PsaA pela cápsula polissacarídica (Johnston e colaboradores, 2004; Jedrzejak, 2001), principalmente na fase lag de crescimento da bactéria (Gor e colaboradores, 2002), tornando esta proteína inacessível ao sistema imune. Entretanto, diversos trabalhos mostraram que diferenças na transparência da cápsula estão diretamente

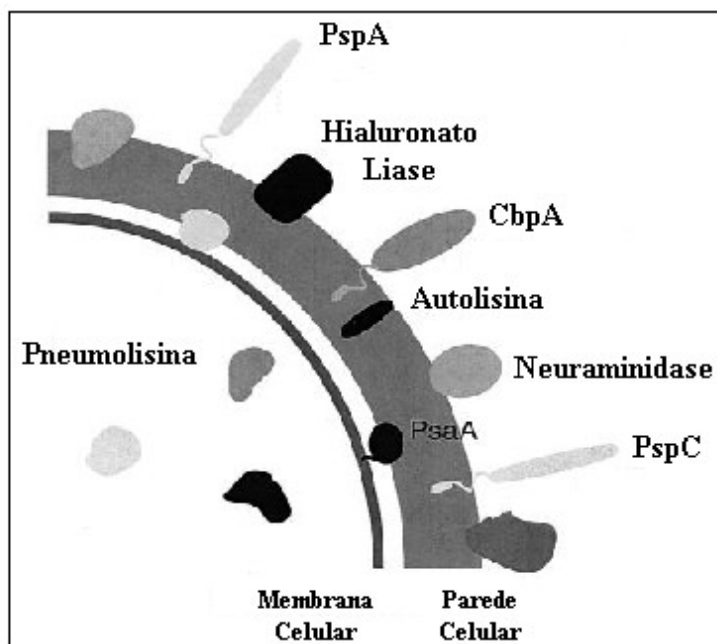


Figura 5: Diagrama esquemático dos principais fatores de virulência de *Streptococcus pneumoniae*. Esta figura foi adaptada de Jedrzejak, 2001.

relacionadas à capacidade de colonização destas linhagens (Romero-Steiner e colaboradores, 2003), através da diminuição da expressão de genes relacionados à síntese da cápsula e aumento da expressão de proteínas de superfície (Kim e Weiser, 1998; Weiser e colaboradores, 1996). Deste modo, através desta mudança de fase, de opaca para transparente, a proteína PsaA poderia estar acessível ao sistema imune na etapa de colonização. Esta hipótese é corroborada pelos resultados dos trabalhos relatados a seguir. Romero-Steiner e colaboradores (2003) mostraram que PsaA recombinante e anticorpos anti-PsaA de origem animal ou humana, são capazes de inibir adesão de várias linhagens de *S. pneumoniae* a células epiteliais da mucosa respiratória *in vitro*. Além disso, imunização intranasal de camundongos com PsaA recombinante, produzida em *E. coli*, com CTB como adjuvante, resultou em inibição de crescimento de *S. pneumoniae* em amostras de lavado nasal e sangue, após desafio intranasal com uma linhagem invasiva (De e colaboradores, 2000). Adicionalmente, um estudo na Finlândia mostrou que a incidência de otite média foi menor em crianças com altos títulos de anticorpos anti-PsaA (Rapola e colaboradores, 2000). PsaA tem se

mostrado muito promissor como componente contra a colonização, através de imunização subcutânea com peptídeos lipidados de PsaA (Johnson e colaboradores, 2002), intranasal com várias linhagens de lactobacilos expressando PsaA (Oliveira e colaboradores, manuscrito submetido), oral com PsaA co-encapsulada com CTB (Seo e colaboradores, 2002) ou intranasal com CTB co-administrado (Briles e colaboradores, 2001; Briles e colaboradores, 2000c). Esta proteção contra colonização, por via intranasal, é sinergisticamente aumentada através da co-administração de PsaA e uma outra proteína de superfície de *S. pneumoniae*, PspA (do inglês Pneumococcal surface protein A) com CTB como adjuvante (Briles e colaboradores, 2000a).

PspA é um importante fator de virulência de pneumococo, localizado na parede celular da bactéria e expresso por todas as linhagens de *S. pneumoniae* caracterizadas até o momento (Crain e colaboradores, 1990). PspA é uma proteína de superfície com massa molecular variável entre 67 e 99 kDa (Waltman e colaboradores, 1990), composta por 4 regiões: uma região N-terminal de α -hélice altamente carregada, uma região rica em resíduos de prolina, uma região de ligação à colina e uma cauda C-terminal de 17 aminoácidos com caráter hidrofóbico (Figura 6) (Hollingshead e colaboradores, 2000). A extremidade C-terminal de PspA se fixa à parede celular da bactéria através de ligação não covalente à colina dos ácidos teicóicos e lipoteicóicos, assim como descrito para outros membros da família das proteínas ligadoras à colina, como CbpA e LytA (autolisina) (Figura 7 A). A região N-terminal possui uma estrutura do tipo “coiled-coil” (Figura 7 B) e é altamente negativa (Jedrzejak e colaboradores, 2001), enquanto que a extremidade C-terminal é altamente positiva, para melhor interação com ácidos teicóico e lipoteicóico (Jedrzejak, 2001). Baseado na sequência de aminoácidos da região N-terminal imediatamente anterior à região rica em resíduos de prolina, a região CDR (do inglês clade-defining region) (Figura 6), os PspAs foram agrupados em clados e estes em famílias (Hollingshead e colaboradores, 2000). A família 1 compreende os clados 1 e 2, a família 2 é composta pelos clados 3, 4 e 5, enquanto que a família 3 é

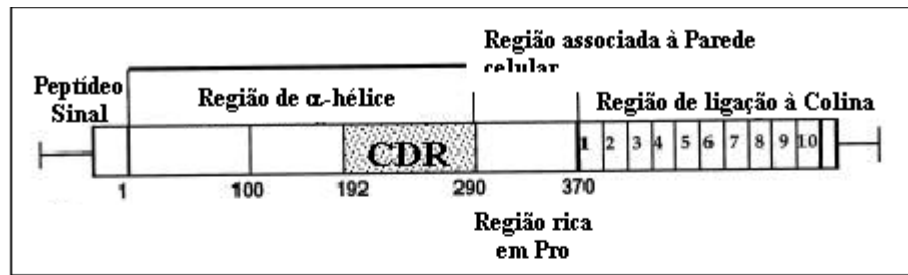


Figura 6: Representação esquemática da proteína PspA. Dentro da região de α -hélice N-terminal, a região CDR (do inglês Clade-defining region) está indicada. Esta figura foi adaptada de Hollingshead e colaboradores, 2000.

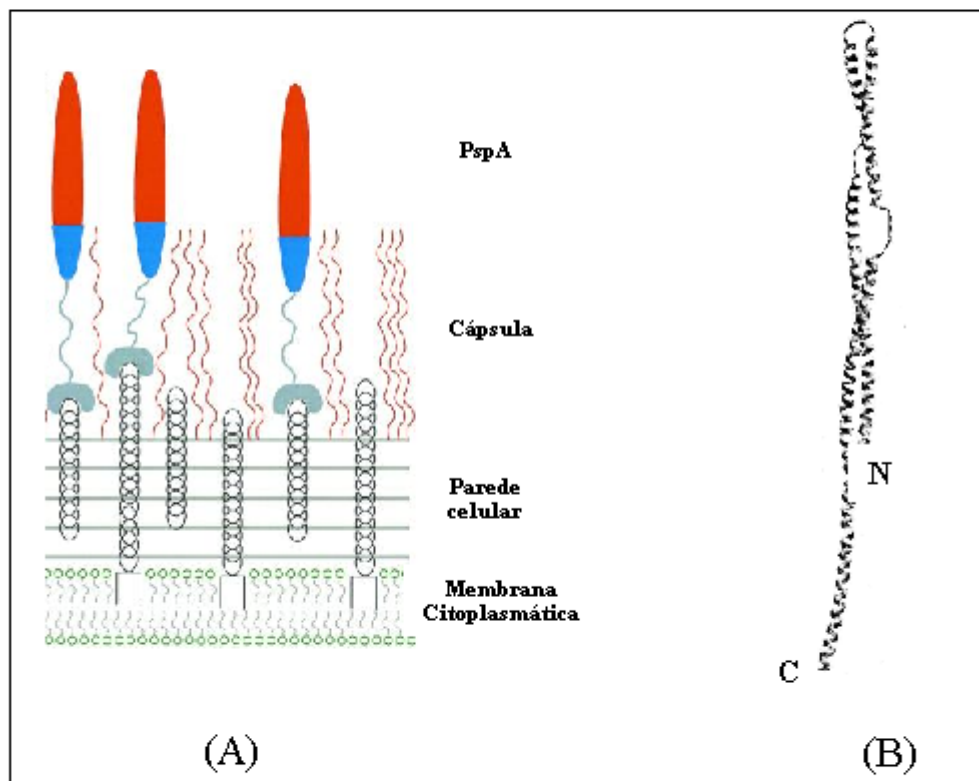


Figura 7: Arranjo esquemático de PspA na superfície de *S. pneumoniae* (A) e modelo estrutural de PspA (B). (A) A natureza das interações de PspA com ácidos teicóico e lipoteicóico expõe a extremidade N-terminal altamente negativa para fora da cápsula polissacarídica. As porções carregadas negativamente (vermelha) e positivamente (azul) estão representadas. (B) A porção N-terminal de PspA tem uma forma de haste alongada, constituída de α -hélices “coiled-coil” anti-paralelas. O desenho é baseado no modelo de uma molécula de PspA contendo dos aminoácidos 1 ao 288. Esta figura foi adaptada de Jedrzejewski, 2001.

formada apenas pelo clado 6. A similaridade entre clados da mesma família é de aproximadamente 70%, enquanto que entre famílias, a similaridade em seqüência geralmente é menor que 50% (Hollingshead e colaboradores, 2000). Dados baseados em 600 linhagens de pneumococo coletadas nos Estados Unidos, Alaska, Canadá, Suécia, Paquistão, Nova Guiné, Gâmbia, China e Coréia mostram que 99% dos isolados expressam PspAs pertencentes às famílias 1 e 2 (Briles e colaboradores, 2000c). Na América do Sul estes resultados são similares, no Brasil (Brandileone e colaboradores, 2004) e na Colômbia (Coral e colaboradores, 2001), a prevalência de linhagens com PspA pertencente às famílias 1 e 2 está por volta de 94% e 97,5% dos isolados, respectivamente.

A carga negativa na extremidade N-terminal da proteína, parte exposta de PspA, está implicada na redução de deposição da proteína de complemento 3 (C3b) na superfície bacteriana, resultando na inibição de opsonofagocitose da bactéria, mediada pela via alternativa de complemento (anticorpo-independente) (Ren e colaboradores, 2004; Jarva e colaboradores, 2003; Tu e colaboradores, 1999). Esta capacidade de PspA interferir no sistema imune complemento do hospedeiro é observada para variantes da família 1 e 2 com a mesma eficiência (Ren e colaboradores, 2003). Além de estar envolvida na inibição de deposição de complemento na superfície da bactéria, PspA é capaz de se ligar a Lactoferrina do hospedeiro, uma glicoproteína que seqüestra ferro das secreções de mucosa. Este é um mecanismo natural de defesa do hospedeiro de restrição da concentração de ferro livre (10^{-18} mol.L⁻¹), de forma a inibir o crescimento de bactérias que necessitam deste metal para se multiplicar, como *S. pneumoniae* (Hammerschmidt e colaboradores, 1999). Esta propriedade é observada nas famílias 1 e 2 de PspA, entretanto PspA pertencente à família 1 possui maior afinidade por Lactoferrina (Ren e colaboradores, 2003). O fragmento de PspA identificado como responsável por esta afinidade está localizado na região C-terminal da α -hélice, do resíduo 167 ao 288 (Hakansson e colaboradores, 2001). Além de seqüestrar ferro das secreções de mucosa, a Apolactoferrina, Lactoferrina sem metais ligados, possui atividade

bactericida contra *S. pneumoniae*, que é prevenida pela ligação de PspA a esta proteína (Shaper e colaboradores, 2004).

Através destes dois mecanismos de virulência, o pneumococo passa facilmente pela primeira linha de defesa do hospedeiro. Após esta etapa, anticorpos anti-capsulares e anti-proteínas de superfície podem mediar imunidade protetora contra este patógeno, principalmente induzidos pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α (Khan e colaboradores, 2002; Kerr e colaboradores, 2002). Em humanos, o número de bactérias na nasofaringe não correlacionou com altos títulos de anticorpos anti-cápsula polissacarídica, mas mostrou estar relacionado ao nível de anticorpos IgG e IgA específicos para a extremidade N-terminal de PspA (McCool e colaboradores, 2002).

Humanos naturalmente infectados ou colonizados com *S. pneumoniae* produzem anticorpos anti-PspA que podem ser detectados no soro e nas secreções de mucosa (Briles, 2004). Além disso, anticorpos preexistentes contra PspA previnem o estabelecimento de colonização por este patógeno (Swiatlo e Ware, 2003). Isto demonstra que PspA é expresso durante o curso da infecção em humanos e é facilmente acessível ao sistema imune (Swiatlo e Ware, 2003). Por este motivo, imunização de camundongos com PspA é capaz de induzir anticorpos específicos, e proteção contra desafios com uma linhagem que possui PspA do mesmo clado (Wu e colaboradores, 1997). Adicionalmente, a imunização ativa de camundongos com PspA inteira ou fragmentos revelaram que a região N-terminal de α -hélice contém os principais epítopos e é o alvo de anticorpos protetores (Tart e colaboradores, 1996). Estes dados foram confirmados pela proteção de camundongos imunizados com vacinas de DNA (Miyaji e colaboradores, 2003; Miyaji e colaboradores, 2002; Borsage e colaboradores, 2001) ou *Salmonella enterica* (Kang e colaboradores, 2002) expressando a região N-terminal de α -hélice em modelos de septicemia. Embora PspA seja uma proteína de seqüência variável, imunização com PspA resulta na produção de anticorpos capazes de reconhecer PspAs pertencentes a outros clados e até outras famílias

(Nabors e colaboradores, 2000). Da mesma forma, observa-se proteção cruzada, através de imunização passiva (Briles e colaboradores, 2000d), mesmo quando os anticorpos são administrados até 12 horas após o desafio (Swiatlo e colaboradores, 2003). Apesar destes dados, aparentemente, uma molécula de PspA não é capaz de induzir reatividade e proteção cruzada para a maioria das linhagens de pneumococo circulantes, principalmente as que contêm PspAs de famílias diferentes. Desta forma, uma vacina mais abrangente deveria conter PspAs de um clado da família 1 e um da família 2, para que a cobertura das linhagens causadoras de doenças invasivas fosse, em teoria, maior que 90% (Swiatlo e Ware, 2003). Além disso, a formulação deveria incluir uma proteína essencial na etapa de colonização da bactéria, como por exemplo PsaA. Em adição a isto, imunização de grávidas, utilizando estes dois antígenos, se mostrou segura e eficiente no sentido de induzir anticorpos, que são transferidos através da placenta para os bebês (Baril e colaboradores, 2004). Estes dados, aliados à observação da maioria das imunizações com estas proteínas utilizarem CTB como adjuvante, foram decisivos na escolha dos antígenos PsaA e PspA clados 1 (família 1) e 3 (família 2) para este estudo, na forma de fusão genética com CTB.