

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
ABREVIATURAS	viii
RESUMO	xi
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Mecanismos bioquímicos de ação da Toxina colérica.....	01
1.2. CT como imunógeno e adjuvante de mucosas.....	04
1.3. CTB como imunógeno e adjuvante de mucosas na forma co-administrada a antígenos.....	07
1.4. CTB como adjuvante de mucosas ou indutor de tolerância na forma fusionada ou quimicamente conjugada a antígenos.....	08
1.5. CT, LT, CTB e mutantes das toxinas como adjuvantes por via de pele.....	10
1.6. Microbiologia de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
1.7. <i>Streptococcus pneumoniae</i> como agente etiológico e medidas profiláticas.....	12
1.8. Proteínas de superfície de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	14
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Lista de soluções e meios de cultura.....	22
3.1.1. Soluções utilizadas.....	22
3.1.2. Meios de cultura utilizados.....	23
3.2. Vetores utilizados.....	24
3.3. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas.....	25
3.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
3.5. Síntese do gene <i>ctxB</i> por PCR.....	26

3.6. Amplificação dos genes <i>psaA</i> e <i>ctbx</i> por PCR.....	27
3.7. Subclonagem dos produtos de PCR no vetor pGEM-T.....	29
3.8. Transformação de bactérias competentes.....	29
3.8.1. Seleção dos clones dos produtos de PCR clonados em pGEM-T.....	30
3.9. Mini-preparações de DNA plasmidial.....	30
3.10. Seqüenciamento de DNA.....	30
3.11. Digestão dos genes e dos vetores com enzimas de restrição.....	31
3.12. Expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> BL21 (SI).....	32
3.13. Purificação das proteínas recombinantes.....	33
3.13.1. Purificação de CTB.....	33
3.13.2. Purificação de PsaA, CTB-PsaA, PspA1, CTB-PspA1, PspA3 e CTB-PspA3.....	35
3.14. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfonato de sódio (SDS-PAGE).....	35
3.15. SDS-PAGE de amostras sem tratamento térmico e redutor.....	36
3.16. Quantificação das proteínas recombinantes.....	36
3.17. Western Blot.....	36
3.18. Ensaio de competição em células adrenais Y1.....	37
3.19. GM1-ELISA.....	37
3.20. Remoção de LPS.....	38
3.21. Ensaio de imunização com as proteínas recombinantes.....	39
3.22. Obtenção dos soros, saliva e lavados nasais e brônquicos.....	40
3.23. ELISA.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1. Amplificações e clonagens dos genes <i>ctxB</i> , <i>ctbx</i> , <i>psaA</i> , <i>pspA1</i> e <i>pspA3</i>	42
4.1.1. Síntese do gene <i>ctxB</i> e amplificação do gene <i>ctbx</i> por PCR e clonagem dos fragmentos.....	42
4.1.2. Amplificação do gene <i>psaA</i> por PCR e clonagens dos genes <i>psaA</i> , <i>pspA1</i> , <i>pspA3</i> e <i>ctbx</i>	44

4.2. Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	44
4.2.1. Expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i> BL21 (SI).....	44
4.2.2. Purificação das proteínas recombinantes por coluna de níquel.....	48
4.3. Caracterização das proteínas recombinantes por Western Blot.....	52
4.4. Ensaio funcional das proteínas CTB, CTB-PsaA, CTB-PspA1 e CTB-PspA3.....	55
4.4.1. Ensaio funcional de CTB em células de córtex adrenal de camundongo Y1.....	55
4.4.2. Ensaio funcional das proteínas CTB-PsaA, CTB-PspA1 e CTB-PspA3 por GM1-ELISA.....	58
4.5. Experimentos de imunização com as proteínas de fusão.....	61
4.5.1. Experimentos com a proteína de fusão CTB-PsaA.....	61
4.5.1.1. A proteína de fusão CTB-PsaA sem a remoção de LPS induz IgG e IgA anti-PsaA e inibe a colonização da nasofaringe de camundongos BALB/C por <i>S. pneumoniae</i>	61
4.5.1.2. Determinação da concentração adjuvante de CTB sem indução inespecífica da resposta imune..	65
4.5.1.3. A proteína de fusão CTB-PsaA após remoção de LPS também induz a produção de IgG e IgA anti-PsaA.....	67
4.5.1.4. A proteína de fusão CTB-PsaA, após remoção de LPS, inibe colonização da nasofaringe de camundongos C57BL/6 por <i>S. pneumoniae</i>	70
4.5.2. Experimentos com as proteínas de fusão CTB-PspA1 e CTB-PspA3.....	72
4.5.2.1. Indução de anticorpos IgG anti-PspA1 e anti-PspA3 em animais imunizados com as proteínas de fusão CTB-PspA1 e CTB-PspA3 por via intranasal ou intradérmica.....	72
4.5.2.2. Proteção parcial contra desafio intraperitoneal com <i>S. pneumoniae</i> em animais imunizados pela via intradérmica com CTB-PspA3, mas não com CTB-PspA1.....	78
4.5.2.3. Determinação da razão IgG1/IgG2a dos soros individuais.....	80
5. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	94
CURRICULUM VITAE.....	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura de raios-X da Toxina Colérica (CT) ou da Toxina Lábil de <i>E. coli</i> (LT).....	02
Figura 02: Estrutura dos receptores celulares monosialogangliosídicos GM1, GM2 e GM3.....	02
Figura 03: Estéreo-representação dos resíduos de CTB envolvidos na interação com GM1.....	03
Figura 04: Rota patogênica de infecção por <i>S. pneumoniae</i>	11
Figura 05: Diagrama esquemático dos principais fatores de virulência de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
Figura 06: Representação esquemática da proteína PspA.....	17
Figura 07: Arranjo esquemático de PspA na superfície de <i>S. pneumoniae</i> (A) e modelo estrutural de PspA (B).....	17
Figura 08: Representação esquemática do vetor pAE e do MCS do mesmo vetor.....	24
Figura 09: Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene <i>ctxB</i> e da proteína CTB, respectivamente.....	28
Figura 10: Esquema de síntese de um gene genérico por PCR.....	43
Figura 11: Gel de agarose 1% do produto de PCR dos genes <i>ctxB</i> (A) e <i>ctxA</i> (B).....	45
Figura 12: Gel de agarose 1% do produto de PCR do gene <i>psaA</i>	45
Figura 13: Cassete de expressão das proteínas de fusão CTB-PsaA, CTB-PspA1 e CTB-PspA3.....	45
Figura 14: Análise de expressão das proteínas recombinantes CTB, PsaA, CTB-PsaA, PspA1, CTB-PspA1, PspA3 e CTB-PspA3 em SDS-PAGE com concentração adequada.....	47
Figura 15: SDS-PAGE 15 % da purificação de CTB a partir de corpúsculos de inclusão.....	49
Figura 16: SDS-PAGE 15% de CTB purificada em condições não-desnaturantes.....	49
Figura 17: SDS-PAGE 15% da purificação de PsaA a partir da fração solúvel de extratos de <i>E. coli</i> induzida.....	51

Figura 18: SDS-PAGE 10% da purificação de CTB-PsaA a partir da fração solúvel de extratos de <i>E. coli</i> induzida.....	51
Figura 19: SDS-PAGE 6% da fusão CTB-PsaA em condições não-desnaturantes.....	53
Figura 20: SDS-PAGE 10% da purificação das proteínas PspA1 (A) e PspA3 (B) a partir da fração solúvel de extratos de <i>E. coli</i> induzida.....	53
Figura 21: SDS-PAGE 10% da purificação da proteína de fusão CTB-PspA1 (A e B) e SDS-PAGE 12% da purificação de CTB-PspA3 (C e D) a partir da fração solúvel de extratos de <i>E. coli</i> induzida.....	54
Figura 22: SDS-PAGE 6% das fusões CTB-PspA1 (A) e CTB-PspA3 (B) em condições não-desnaturantes.....	56
Figura 23: Western Blot de CTB com anti-CT e anti-CTB.....	56
Figura 24: Western Blot da proteína de fusão CTB-PsaA com anti-CTB e anti-PsaA.....	57
Figura 25: Western Blot das proteínas de fusão CTB-PspA1, com anti-CTB e anti-PspA1 e de CTB-PspA3 com anti-CTB e anti-PspA3.....	57
Figura 26: Ensaio funcional da CTB recombinante em células adrenais Y1.....	59
Figura 27: GM1-ELISA das proteínas de fusão CTB-PsaA, CTB-PspA1 e CTB-PspA3.....	60
Figura 28: Indução de anticorpos IgG anti-PsaA após imunização intranasal de camundongos Balb/C com as diferentes proteínas recombinantes sem remoção de LPS.....	63
Figura 29: Indução de anticorpos IgA anti-PsaA após imunização intranasal de camundongos BALB/C com as diferentes proteínas recombinantes sem remoção de LPS.....	63
Figura 30: Ensaio de colonização da nasofaringe de camundongos BALB/C após imunização intranasal com as diferentes proteínas recombinantes sem remoção de LPS.....	64
Figura 31: Ensaio de colonização da nasofaringe de camundongos BALB/C após imunização intranasal com várias condições de CTB.....	66

Figura 32: Indução de anticorpos IgG e IgA anti-PsaA após imunização intranasal de camundongos BALB/C com diferentes proteínas recombinantes após remoção de LPS.....	68
Figura 33: Indução de anticorpos IgG e IgA anti-PsaA após imunização intranasal de camundongos C57BL/6 com diversas proteínas recombinantes após remoção de LPS.....	70
Figura 34: Ensaio de colonização da nasofaringe de camundongos C57BL/6 após imunização intranasal com diferentes proteínas recombinantes após remoção de LPS.....	71
Figura 35: Indução de anticorpos IgG anti-PspA1 após imunização intranasal ou intradérmica de camundongos BALB/C com as diferentes proteínas recombinantes após remoção de LPS.....	74
Figura 36: Indução de anticorpos IgG anti-PspA3 após imunização intranasal ou intradérmica de camundongos BALB/C com as diferentes proteínas recombinantes após remoção de LPS.....	76
Figura 37: Determinação de isotipos IgG1 e IgG2a de soros individuais de camundongos BALB/C imunizados com as diferentes proteínas recombinantes após remoção de LPS.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Massas moleculares e pontos isoelétricos (pIs) das proteínas recombinantes.....	46
Tabela 02: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de níveis de IgG, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB-PsaA 5 µg (<i>p</i> valor 2) ou PsaA (<i>p</i> valor 3) nos soros individuais da figura 28.....	62
Tabela 03: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de níveis de IgA, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB-PsaA 5 µg (<i>p</i> valor 2) ou PsaA (<i>p</i> valor 3) dos lavados individuais da figura 29.....	62
Tabela 04: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de log de CFU, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB-PsaA 5 µg (<i>p</i> valor 2) ou PsaA (<i>p</i> valor 3) dos lavados individuais da figura 30.....	65
Tabela 05: Teste exato de Fisher para comparações, de número de animais colonizados, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor) da figura 30.....	65

Tabela 06: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de log de CFU, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB 4 µg 3x (<i>p</i> valor 2) e CTB 1.6 µg 3x da figura 31.....	66
Tabela 07: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de níveis de IgG, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB-PsaA 5 µg (<i>p</i> valor 2) ou PsaA (<i>p</i> valor 3) dos soros individuais da figura 32.....	68
Tabela 08: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de níveis de IgG, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB-PsaA 5 µg (<i>p</i> valor 2) ou PsaA (<i>p</i> valor 3) dos soros individuais da figura 33.....	69
Tabela 09: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de log de CFU, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB-PsaA 5 µg (<i>p</i> valor 2) ou PsaA (<i>p</i> valor 3) dos lavados nasais individuais da figura 34.....	71
Tabela 10: Teste exato de Fisher para comparações, de número de animais colonizados, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor) da figura 34.....	72
Tabela 11: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de níveis de IgG da imunização intranasal, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB-PspA1 (<i>p</i> valor 2) ou PspA1 (<i>p</i> valor 3) dos soros individuais da figura 35.....	75
Tabela 12: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de níveis de IgG da imunização intradérmica, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB-PspA1 (<i>p</i> valor 2) ou PspA1 (<i>p</i> valor 3) dos soros individuais da figura 35.....	75
Tabela 13: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de níveis de IgG da imunização intranasal, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB-PspA3 (<i>p</i> valor 2) ou PspA3 (<i>p</i> valor 3) dos soros individuais da figura 36.....	77
Tabela 14: Teste <i>t</i> de Student para comparações, de níveis de IgG da imunização intradérmica, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor 1), CTB-PspA3 (<i>p</i> valor 2) ou PspA3 (<i>p</i> valor 3) dos soros individuais da figura 36.....	77

Tabela 15: Teste exato de Fisher para comparações, de número de animais sobreviventes ao desafio do experimento da via intranasal e controles, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor) do desafio intraperitoneal com a linhagem St 491/00.....	78
Tabela 16: Teste exato de Fisher para comparações, de número de animais sobreviventes ao desafio do experimento da via intradérmica e controles, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor) do desafio intraperitoneal com a linhagem St 491/00.....	79
Tabela 17: Teste exato de Fisher para comparações, de número de animais sobreviventes ao desafio do experimento da via intranasal e controles, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor) do desafio intraperitoneal com a linhagem St 679/99.....	80
Tabela 18: Teste exato de Fisher para comparações, de número de animais sobreviventes ao desafio do experimento da via intradérmica e controles, par-par entre as condições e Salina (<i>p</i> valor) do desafio intraperitoneal com a linhagem St 679/99.....	80

ABREVIATURAS

- A: absorbância
 ACTH: Hormônio adrenocortitrópico
 Amp: ampicilina
 ATP: adenosina trifosfato
 BCG: Bacilo Calmette-Guerin
 BSA: Albumina bovina sérica
 bp: pares de bases
 cAMP: adenosina monofosfato cíclica
 CbpA: Choline binding protein A
 CDR: Clade-defining region
 CFU: Unidades formadoras de colônia (colony-forming units)
 CRM-197: Toxina Diftérica mutada e inativada
 CT: Toxina colérica

CTA: Subunidade A da Toxina colérica
CTB: Subunidade B da Toxina colérica
DME: Meio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagles's)
dNTPs: deoxinucleotídeos trifosfato
EDTA: ácido etileno diamino tetracético
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica
FCS: Soro fetal bovino (fetal calf serum)
GDP: guanosina difosfato
GTP: guanosina trifosfato
HIV: Vírus da Imunodeficiência humana
IFN- γ : interferon-gama
IgA, IgE, IgG e IgM: Imunoglobulinas A, E, G e M
IL: interleucina
KDa: kilo Dalton
KLH: Keyhole limpet hemocyanin
LPS: Lipopolissacarídeo
LT: Toxina Lábil de *Escherichia coli*
LTB: Subunidade B da Toxina lábil de *Escherichia coli*
LytA: Autolisina de *Streptococcus pneumoniae*
MALT: Tecido linfóide associado à mucosa
NAD: nicotinamida adenosina dinucleotídeo
OPD: o-diidrocloroeto fenilendiamina
OVA: ovalbumina
PBS: tampão fosfato-salina (phosphate buffer saline)
PCR: reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
pI: ponto isoelétrico
PsaA: Pneumococcal surface adhesin A
PspA e PspC: Pneumococcal surface protein A e C
PT: Toxina Pertussis
RBS: sítio de ligação ao ribossomo (ribosome binding site)
SALT: Tecido linfóide associado à pele

SDS: dodecil sulfonato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

S-IgA: Imunoglobulina A secretória

Sm14: proteína ligadora de ácidos graxos de *Schistosoma mansoni*

TAE: tampão tris-acetato e EDTA

TE: tampão tris-EDTA

Th1: células auxiliaadoras tipo 1 (T helper 1)

Th2: células auxiliaadoras tipo 2 (T helper 2)

T_m: temperatura de dissociação (melting temperature)

TNF- α : Tumor necrosis fator α

TT: Toxóide tetânico

RESUMO

A colonização da mucosa respiratória é a primeira etapa na patogênese de *Streptococcus pneumoniae*, bactéria causadora de pneumonia, meningite, e otite média, responsável por mais de um milhão de mortes por ano no mundo. As proteínas de superfície PsaA e PspA têm sido investigadas como candidatos vacinais para estas doenças. CTB é a porção não tóxica da toxina colérica (CT), responsável pela ligação da toxina ao receptor celular GM1 e descrita como adjuvante de mucosas. Neste trabalho, estes genes de *S. pneumoniae* foram clonados em pAE, um vetor de expressão de *E. coli*, que utiliza o promotor T7, ou a 3' de *ctxB* no plasmídeo pAE-ctxB. As proteínas recombinantes CTB, PsaA, CTB-PsaA, PspA1, CTB-PspA1, PspA3 e CTB-PspA3 foram expressas em *E. coli* BL21 (SI) e purificadas através de coluna carregada com níquel. Ensaio de ligação ao receptor GM1 mostraram que CTB e a porção CTB das proteínas de fusão foram obtidas na forma funcional. Imunização por via intranasal com CTB-PsaA e, por via intranasal e intradérmica com CTB-PspA1 e CTB-PspA3 induziu a produção de IgG no soro. Em compensação, somente a imunização com a fusão CTB-PsaA induziu produção de IgA nas secreções de mucosa. Ensaio de colonização da nasofaringe de camundongos BALB/C e C57BL/6 mostraram que a imunização intranasal com CTB-PsaA resulta em diminuição de colonização por *S. pneumoniae*. Desafios letais com linhagem virulenta de *S. pneumoniae* mostraram que a imunização intradérmica com CTB-PspA3, ao contrário da imunização intranasal, é capaz de proteger os animais. Uma vez que estas proteínas de fusão induziram resposta imune protetora, estas deverão ser investigadas como componentes de uma nova vacina para infecções causadas por *S. pneumoniae*.

SUMMARY

The colonization of the respiratory mucosa is the first step in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*, bacterium that causes pneumonia, meningitis and otitis media. It is responsible for more than one million deaths per year worldwide. The surface proteins PsaA and PspA have been investigated as vaccine candidates against these diseases. CTB is the non-toxic portion of cholera toxin (CT), responsible for the toxin binding to the cellular receptor GM1 and described as mucosal adjuvant. In this study, these genes from *S. pneumoniae* were cloned in pAE, an *E. coli* expression vector that uses T7 promoter, or downstream to *ctxB* gene in the pAE-ctxB plasmid. The recombinant proteins CTB, PsaA, CTB-PsaA, PspA1, CTB-PspA1, PspA3 and CTB-PspA3 were expressed in *E. coli* BL21 (SI) and purified through a chelating resin charged with nickel. GM1 binding assays showed that CTB and CTB portion of the fusion proteins were functional. Intranasal immunization with CTB-PsaA and, intranasal and intradermal administration of CTB-PspA1 and CTB-PspA3 induced IgG production in the serum. On the other hand, only CTB-PsaA fusion protein induced IgA in the mucosal secretions. Nasopharyngeal colonization assays in BALB/C and C57BL/6 mice showed that intranasal immunization with CTB-PsaA results in a decrease of colonization by *S. pneumoniae*. Lethal challenges with *S. pneumoniae* virulent strains indicated that intradermal immunization with CTB-PspA3, in contrast to the intranasal immunization, is able to protect mice. Since the fusion proteins induced a specific immune response, they should be further investigated as components of a new vaccine against infections caused by *S. pneumoniae*.