

LUKAS RAPOSO

**ABORDAGEM VACINAL CONTRA *Streptococcus agalactiae* BASEADA EM
VACINA DE DNA**

São Paulo

2021

LUKAS RAPOSO

**ABORDAGEM VACINAL CONTRA *Streptococcus agalactiae* BASEADA EM
VACINA DE DNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantã e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2021

LUKAS RAPOSO

**ABORDAGEM VACINAL CONTRA *Streptococcus agalactiae* BASEADA EM
VACINA DE DNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantã/ IPT, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof(a) Dr(a). Rita de Cassia Café Ferreira

Versão original.

São Paulo

2021

RESUMO

LUKAS, R. **Abordagem vacinal contra *streptococcus agalactiae* baseada em vacina de DNA**. 2021. 56 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do Grupo B (GBS - *group B Streptococcus*) é um coco gram-positivo, caracterizado por seu potencial em causar doenças invasivas em recém-nascidos (RNs) como sepse, meningite e pneumonia. Diversos microrganismos patogênicos são capazes de expressar diferentes proteínas, as quais podem representar antígenos relevantes para indução de proteção no hospedeiro. A Proteína Transportadora de Poliaminas D (PotD), é uma proteína de superfície, conservada entre os diferentes sorotipos de GBS (Ia, Ib, II ao IX), pertencendo à uma grande família de transportadores ativos em diversas células. As poliaminas são fundamentais para a sobrevivência e crescimento da célula, exercendo funções metabólicas e fisiológicas. Vacinas de DNA possuem em sua formulação genes do patógeno que são responsáveis por codificar proteínas que podem conter epítomos antigênicos que conferem imunidade ao hospedeiro, resultando em uma proteção imunológica. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver uma abordagem vacinal baseada no uso de vacina de DNA, utilizando o gene *potD* para indução de resposta imune contra o patógeno. Através da clonagem, a construção vacinal *pVAX-potD* foi testada em cultura de células de mamíferos HEK293T. Os resultados obtidos até o momento sugerem que com apenas uma única dose da vacina de DNA, administrada em camundongos, utilizando eletroporação, o sistema imune foi capaz de reconhecer o antígeno alvo e gerar anticorpos específicos contra a bactéria.

Palavras-chave: *Streptococcus*. Vacinas. DNA. PotD

ABSTRACT

LUKAS, R. **Vaccine approach against *Streptococcus agalactiae* based on DNA vaccine.** 2021. 56 p. Master thesis (Master in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Group B *Streptococcus agalactiae* (GBS) is a gram-positive coccus characterized by its potential to cause invasive diseases in newborns (NBs) such as sepsis, meningitis, and pneumonia. Several pathogenic microorganisms can express different proteins, which may represent antigens relevant to induction of protection in the host. Polyamine Carrier Protein D (PotD) is a surface protein, conserved among the different GBS serotypes (Ia, Ib, II to IX), belonging to a large family of active transporters in several cells. Polyamines are fundamental for cell survival and growth, performing metabolic and physiological functions. DNA vaccines have pathogen genes in their formulation that are responsible for encoding proteins that may contain antigenic epitopes that confer immunity to the host, resulting in immune protection. Thus, the objective of this work is to develop a vaccine approach based on the use of DNA vaccine, using the potD gene to induce immune response against the pathogen. Through cloning, the pVAX-potD vaccine construction was tested in HEK293T mammalian cell culture. The results obtained so far suggest that with only a single dose of the DNA vaccine, administered in mice, using electroporation, the immune system was able to recognize the target antigen and generate specific antibodies against the bacterium.

Palavras-chave: *Streptococcus*. Vaccine. DNA. PotD

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Streptococcus agalactiae*

Inúmeras doenças causadas por diferentes patógenos podem acometer o bem-estar e a saúde do ser humano, resultando em altos índices de morbidade e mortalidade. Devido a imaturidade do sistema imunológico, neonatos apresentam maior vulnerabilidade a uma gama de patógenos como bactérias, vírus, fungos ou parasitas, resultando em um cenário de condições clínicas e físicas ideais para a instalação de infecções (VERSTRAETE, 2015). Em todo o mundo, aproximadamente 22% das mortes por infecções neonatais são decorrentes de sepse, pneumonia, meningite e tétano (MITRA, 2018).

Dentre as bactérias de interesse clínico, o *Streptococcus agalactiae* ou *Streptococcus* do Grupo B (GBS - *group B Streptococcus*) é um coco gram-positivo de formato esférico, disposto aos pares ou em pequenas cadeias, possuindo uma característica bioquímica marcante, a presença de beta hemólise, além de ser catalase negativo (FIOLO, 2012; CASTELLANO-FILHO, 2010). Esta é uma bactéria comensal que coloniza o trato gastrointestinal e geniturinário de aproximadamente 50% dos indivíduos saudáveis (LIN, 2018), porém, em determinadas circunstâncias, este colonizador assintomático pode ser responsável por causar graves infecções neonatais (DELFANI, 2017), colocando-o como um dos patógenos de maior impacto na promoção de infecções neonatais invasivas de relevante grau de morbimortalidade (SEALE, 2017).

O GBS foi primeiramente identificado em 1887 como agente causador de mastite bovina e, anos mais tarde (1935), cepas humanas foram isoladas de gestantes e, somente após o início da década de 1960, passou a ser associado às doenças neonatais, com relatos esporádicos de amostras realizadas em culturas vaginais provenientes de mulheres assintomáticas (DOARE, 2013). Hoje em dia, sabe-se que o GBS possui a capacidade de causar doenças não só em humanos e bovinos, mas também em certas espécies de peixes, cavalos, macacos, hamsters, cães e camelos (BOWATER, 2018).

Em peixes, a septicemia e meningite estão entre as principais doenças relacionadas ao GBS, causando um grande impacto na economia da aquicultura, um fator de extrema relevância visto que, de acordo com o anuário da Associação Brasileira da Piscicultura (2019), o Brasil ocupa o 4º lugar como maior produtor mundial de tilápias. Por outro lado, em bovinos, a infecção pelo *S. agalactiae* resulta principalmente em mastite, o que também leva à grandes perdas econômicas na pecuária, como por exemplo, afetando a produção de leite (KEEFE, 2012).

Gestantes, idosos e imunocomprometidos representam os três grupos de risco mais susceptíveis à infecção pelo GBS (SCHUCHAT, 1998). Em relação às gestantes, cerca de 40% possuem a vagina

e o reto colonizados pelo GBS, caracterizando o principal grupo colonizado pelo patógeno (CAMPBELL, 2000; VERANI, 2010; BRZYCHCZY-WLOCH, 2014). No entanto, apenas 2% dos recém-nascidos são infectados pelo estreptococo através da broncoaspiração do líquido amniótico contendo a bactéria, ou no momento do nascimento, ao passar pelo canal vaginal também contaminado com a bactéria (figura 1) (MORGAN, 2019; DELFANI, 2017), levando ao desenvolvimento de infecções neonatais, como sepse, meningite e pneumonia (GIBBS, 2004; COUTINHO *et al.*, 2011).

Em humanos, a infecção invasiva pelo GBS é classificada em (i) doença de início precoce (*early onset disease – EOD*), ocorrendo antes dos 7 primeiros dias de vida do recém-nascido, sendo comum dentro das primeiras 24 horas, resultando em quadros de bacteremia/sepse sem foco (83%), pneumonia (9%) ou meningite (7%); e (ii) doença de início tardio (*late-onset disease – LOD*), que ocorre entre 7 e 89 dias de vida, com uma média de 37 dias – gerando quadros de bacteremia/sepse sem foco (65%), meningite (27%) e pneumonia (3%) (MULLER, 2006; PHARES, 2008; SIMONSEN, *et al.*, 2014; VORNHAGEN, 2017).

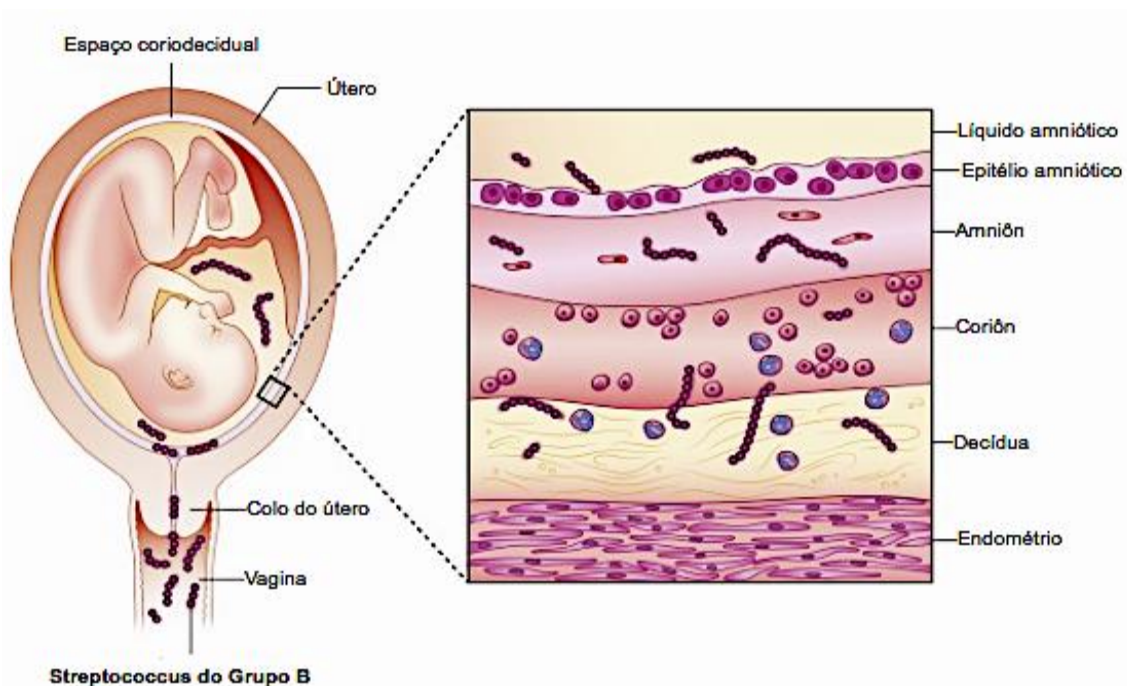


Figura 1. Infecção ascendente pelo GBS. Devido aos vários fatores de virulência expressos pelo GBS, a bactéria ascende do canal vaginal, invadindo os anexos embrionários das membranas placentárias (córion e âmnion) e cavidade amniótica, assim alcançando o feto. **Fonte:** adaptado de Vornhagen e colaboradores (2017).

De acordo com as normas preconizadas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), as gestantes entre 35-37 semanas de gravidez devem ser submetidas ao rastreamento para a avaliação da presença ou não do GBS, pois a chance de transmissão vertical é alta (VERANI, 2010). A maioria

dos trabalhos disponíveis na literatura utilizam esta metodologia, coletando amostras dos sítios vaginal e anal, com dois *swabs* e inoculação separada em meio seletivo por 18 a 24 horas (REZENDE, *et al.*, 2010).

A profilaxia antibiótica intraparto para as gestantes colonizadas pelo *S. agalactiae* é a única forma de intervenção até os dias atuais, com a finalidade de prevenir e tratar. Os betalactâmicos, como penicilinas e as aminopenicilinas, são as drogas de primeira escolha para combater infecções por GBS (VERANI, 2010), uma vez que seu mecanismo de ação está direcionado ao bloqueio da síntese do peptidoglicano, inibindo irreversivelmente a enzima transpeptidase, D-D-carboxitranspeptidase, também conhecida como PBP (*penicillin-binding-protein*), o que impede a formação de ligações entre as cadeias peptídicas que formam a parede celular da bactéria (GUIMARÃES *et al.*, 2010; ARRUDA *et al.*, 2019).

Em casos de gestantes alérgicas aos beta-lactâmicos, são administradas drogas de segunda linha, representadas pelos macrolídeos (eritromicina), que possuem propriedades antibacterianas por ligarem-se à subunidade 50S do ribossomo, resultando no bloqueio da síntese protéica da bactéria, fazendo com que o RNA transportador seja impedido de transferir os aminoácidos para a cadeia polipeptídica que está sendo formada e, pelas lincosamidas (clindamicina) que, possuem o mesmo espectro de ação e mesma propriedade antibacteriana dos macrolídeos (HAYS, *et al.*, 2016).

Contudo, é preciso dar atenção às falhas decorrentes da administração da profilaxia antibiótica, que podem resultar na seleção de cepas de GBS resistentes aos antibióticos utilizados no tratamento, podendo levar ao aumento de sepse neonatal (CASTOR, 2008). Além disso, a profilaxia antibiótica intraparto não é capaz de diminuir a ocorrência de sepse de início tardio (BOLDENOW, 2016).

1.2. Epidemiologia

No início da década de 70, nos Estados Unidos, o GBS emergiu como um grande causador de infecções neonatais, resultando em uma taxa de mortalidade de até 50% (COSTA, 2010). Atualmente, o GBS continua sendo umas das principais causas de meningite e septicemia neonatal nos EUA (STOLL, 2011). Ainda, além de gestantes e recém-nascidos, outros grupos de risco para infecção por GBS incluem mulheres adultas não gestantes, idosos e pacientes imunocomprometidos (HANSEN, 2004; PHARES *et al.*, 2008).

No estudo realizado por Campbell (2000), com 3307 mulheres grávidas, identificou-se que 26% (856) das gestantes apresentavam colonização por GBS e a maior taxa de colonização ocorria entre mulheres negras. A transmissão vertical por GBS ocorre em cerca de 30 a 70% dos casos e, assim, as gestantes colonizadas podem transmitir o patógeno aos seus filhos antes ou durante o parto,

quer seja pela aspiração do líquido amniótico contaminado com a bactéria ou, até mesmo, no momento da passagem da criança pelo canal vaginal (BAKER, 1973; MOYO, 1996).

O GBS é classificado em sorotipos de acordo com a composição da cápsula polissacarídica, que é um dos principais fatores de virulência da bactéria, permitindo a evasão do sistema imune do hospedeiro. Atualmente, são reconhecidos 10 sorotipos de GBS (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX), porém, a literatura descreve os sorotipos Ia, Ib, II, III e V como os mais prevalentes em infecções humanas (WANG, 2013).

Desde a década de 70 o sorotipo III tem sido reportado na literatura como o de maior prevalência em infecções neonatais. O sorotipo III do GBS tem sido fortemente associado à maioria dos casos de meningite neonatal até os dias atuais, sendo responsável por 40% dos casos de infecção neonatal precoce e 60% dos casos de infecção neonatal tardia em todo o mundo (EDMOND et al., 2012).

A nível mundial, em Pequim – China, estudos apontam o sorotipo III como o mais prevalente, seguido pelo Ia, V, Ib e II (LU, 2014). Em Bangladesh, um estudo performado com 1151 gestantes com idade gestacional entre 34,6 e 38,8 semanas identificou que 172 das grávidas apresentavam colonização por GBS. Na África Subsaariana, nas Américas e na Europa o percentual é de 21-22, 19,7-24 e 19%, respectivamente. Durante o ano de 2000-2001, no Reino Unido, houve um total de 568 casos, com uma incidência de 0,72/1000 nascidos vivos (HEATH et al., 2004). Na Escócia, a incidência foi de 0,42/1000 e na Irlanda do Norte 0,9/1000 (HEATH, 2011).

Em 2017, a Europa conduziu um estudo que contou com a ajuda de mais de 100 pesquisadores, o qual foi publicado no renomado jornal científico *Clinical Infectious Disease*, objetivando analisar a taxa de colonização pelo GBS em todo o mundo, gerando dados altamente preocupantes. Foi identificado que 21,7 milhões de gestantes são colonizadas pelo GBS, gerando uma proporção média onde a cada 5 gestantes, uma carrega a bactéria. No entanto, os dados chamam atenção devido a uma grande parcela não ser tratada, o que aumenta ainda mais os índices de casos pelo GBS em todo o mundo (WHO-a, 2017).

Ainda, dentre os 195 países estudados, foi realizado um ranking com os 10 países de acordo com a taxa de colonização (figura 2), onde o Brasil ocupa o 6º lugar, juntamente com o Paquistão, totalizando 700 mil gestantes colonizadas pelo GBS. Em primeiro lugar encontra-se a Índia (2,5 milhões), seguida pela China (1,9 milhões) e Nigéria (1,1 milhão) (WHO-b, 2017).

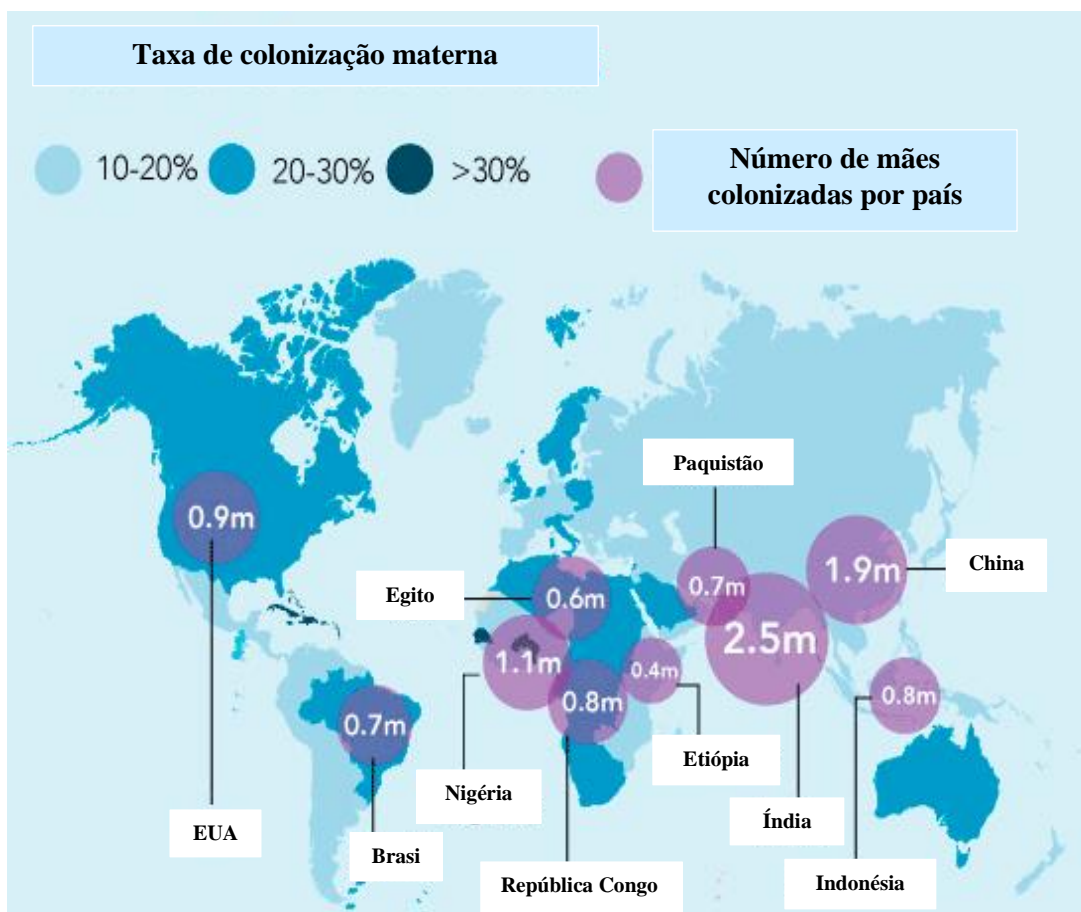


Figura 2. Ranking de países de acordo com a taxa de colonização por GBS. Fonte: adaptado de Clinical Infectious Disease Journal, 2017.

Um estudo realizado no Centro de Referência para Estreptococos, na França, entre o período de 2007 a 2012, foram analisados 438 casos de infecção neonatal invasiva por GBS, onde 154 casos ocorreram nas primeiras 48 horas após o nascimento (infecção precoce) e 190 entre 14-56 dias de vida (infecção tardia). Além disso, verificou-se que os casos de bacteremia sem foco, meningite e infecção respiratória decorrentes da forma precoce foi de 103, 43 e 10 casos, respectivamente (JOURNEL *et al*, 2015).

Na América Latina a epidemiologia da doença causada pelo GBS tem sido pouco abordada na literatura, embora alguns estudos no Brasil tenham mostrado diferentes taxas de colonização pelo estreptococo, variando entre 16,6% a 27,6%. Estas variações podem ser atribuídas às características das populações estudadas, assim como idade, paridade, nível socioeconômico e localização geográfica, além da variação da metodologia bacteriológica de cultura empregada em cada estudo (POGERE, 2005).

No Rio de Janeiro, um estudo realizado com 3.647 gestantes, durante 8 anos (2008-2015), identificou uma taxa de colonização pelo GBS de 26,2% (956) em gestantes com idade gestacional entre 35-37 semanas, sendo os sorotipos Ia, Ib, II, III, IV e V os de maior prevalência, com um

percentual de 11,2%, 19,9%, 6,8% 3,5% e 9,2%, respectivamente (BOTELHO, 2018).

Ainda, no Brasil, um estudo conduzido em 21 municípios pertencentes ao 18º Departamento Regional de Saúde do Paraná, foi demonstrado que dentre as 496 gestantes (35-37 semanas) estudadas, 141 (28,4%) foram positivas para GBS, revelando nesse estudo uma frequência de colonização acima dos valores encontrados em demais estudos realizados no Brasil (MELO, 2018).

1.3. Imunização

Partindo do princípio de que a transferência transplacentária de anticorpos presentes no soro materno pode promover a proteção do bebê contra a infecção por GBS, as vacinas atuam como um método vantajoso e prático para a prevenção da colonização por este patógeno durante a gravidez. Vacinas podem ser capazes de induzir proteção através da produção de anticorpos soro-específicos, que por sua vez, podem atuar contra polissacarídeos capsulares do GBS, prevenindo tanto a forma precoce, quanto à forma tardia da doença, além de levar à indução de uma resposta celular que pode influenciar na melhor proteção do hospedeiro (BAKER, 1976).

Vacinas conjugadas contendo os cinco principais sorotipos de GBS (Ia, Ib, II, III e V) mostraram-se vantajosas, podendo prevenir em até 85% a infecção causada pelo *S. agalactiae* em RNs com idade inferior a 3 meses. Em uma análise realizada com base na comparação de diferentes estratégias em gestantes: (i) sem intervenção, (ii) intervenção vacinal com GBS, (iii) intervenção com profilaxia antibiótica e (iv) intervenção com vacinação mais profilaxia antibiótica, revelou que a vacinação com GBS pode prevenir até 54% dos casos infantis de GBS, quando comparada ao grupo que não recebeu intervenção, sugerindo, assim, que a vacinação pode ser a solução mais eficaz para a diminuição das taxas de doenças infantis por GBS, além do baixo custo (KIM et al., 2014).

É possível notar que o GBS é amplamente distribuído em diferentes regiões do mundo, o que leva a uma real necessidade da implementação de novas medidas de prevenção, assim como a vacinação, que visa minimizar a infecção pelo GBS em gestantes, prevenindo a ocorrência de doenças neonatais, principalmente a sepse, meningite e pneumonia.

Até o presente momento, ensaios clínicos com vacinas destinadas ao GBS estão sendo realizados com uma vacina trivalente (Ia, Ib e III) e outra pentavalente (Ia, Ib, II, III e V) conjugadas ao polissacarídeo de GBS, que estão em fase 1b/2 e fase 1, respectivamente (MADHI, 2017; LIN, 2018). Além disso, com a descoberta de novos antígenos de superfície como alvos vacinais, grupos de pesquisadores passaram a focar na abordagem vacinal com proteínas, não só pela sua fácil produção, mas também por se mostrarem imunologicamente vantajosas, ao serem mais acessíveis às células de

defesa, induzindo uma resposta imune de maior duração, mais eficiente e protetora contra infecções causadas pelo patógeno (NUCCITELLI et al., 2015).

Dentre os diferentes tipos de imunizantes conhecidos, vacinas de DNA podem oferecer vantagens em relação às vacinas convencionais, que utilizam proteínas ou carboidratos em sua composição. Dentre as vantagens, pode-se incluir a fácil manipulação e obtenção, com produção em larga escala; resultando em formulações vacinais economicamente mais viáveis, pois geralmente requerem apenas um passo de clonagem do inserto ao vetor, sem a necessidade de purificação da proteína, reduzindo ainda mais os custos e o tempo de fabricação. Além disso, por serem mais estáveis à temperatura ambiente e ao calor, estas vacinas requerem uma cadeia de transporte mais barata, sem a necessidade de refrigeração e, ainda, o antígeno codificado pela vacina de DNA pode ser apresentado tanto pelo MHC I ou MHC II, resultando na ativação de células TCD4+ e TCD8+ e, logo, induzindo a ativação de resposta imunológica humoral e celular (LIU, 2011; LI, 2016).

1.4. Poliaminas

Estudos sobre as poliaminas tiveram seu início no século XVII, mais precisamente em 1678, quando o pesquisador holandês Antonie van Leeuwenhoek, a pedido da instituição científica The Royal Society, fundada no ano de 1660 em Londres, para que o mesmo fizesse uma análise do sêmen humano (URIEL, 2010). Sendo assim, a partir de seu microscópio, ainda primitivo, Leeuwenhoek realizou uma análise de amostras não frescas de fluido seminal, observando que após vários dias, pôde notar que agregados de cristais eram formados (LEEUWENHOECK, 1678). Porém, somente em 1924 – 250 anos após a descoberta de Leeuwenhoek, Rosenhein, em seus experimentos, trouxe à tona a correta estrutura das poliaminas, que logo foram sintetizadas quimicamente (ROSENHEIM, 1924; DUDLEY *et al.*, 1926).

Devido sua ampla gama de ação sobre as células, as poliaminas vêm se tornando alvo de diversos estudos, a fim de elucidar ainda mais seus aspectos biológicos, bem como sua relação com determinadas doenças. As poliaminas são produtos derivados do catabolismo da arginina (aminoácido polar básico de carga positiva). Existe uma grande variedade de poliaminas biológicas, cada uma com sua respectiva fórmula química (tabela 1), porém dentre os constituintes mais comuns das poliaminas pode-se destacar a espermina, espermidina e putrescina, seguidas pela cadaverina (RAMANI, 2014; MILLER-FLEMING *et al.*, 2015). São moléculas alifáticas nitrogenadas de baixo peso molecular; com dois ou mais grupamentos amino (-NH₂); se apresentam como polications flexíveis, com 2, 3 ou 4 cargas positivas; valores de pK entre 8,3 a 10,9; ubíquas e conservadas em todas as espécies vivas

procarióticas e eucarióticas (com exceção da *Methanobacteriales* e *Halobacteriales*, da ordem de *Archea*) (LIU, 2017; BENCINI, et al., 1999).

As poliaminas se ligam à uma diversidade de moléculas de cargas negativas, assim como DNA, RNA, ATP, e algumas proteínas e fosfolipídeos, ou seja, são compostos essenciais à sobrevivência da célula, atuando no crescimento, diferenciação, desenvolvimento e proliferação celular, imunidade, apoptose, ação de migração das células, regulação de genes, estabilização da molécula de DNA, além de participar da síntese de ácidos nucleicos e proteínas (BAE, 2018; SCHIPPER, 2000).

As poliaminas, são sintetizadas, catabolizadas e transportadas de acordo com o requerimento da célula. A fonte primária das poliaminas é derivada predominantemente do aminoácido ornitina e metionina, enquanto arginina e lisina servem como fonte secundária a esses metabólitos (MILLER-FLEMING, *et al.*, 2015). Em suma, a biossíntese inicia-se com a produção de putrescina, a partir da descarboxilação da ornitina, pela ação da enzima ornitina descarboxilase. A espermidina é sintetizada a partir da putrescina, e a espermina a partir da espermidina, graças à adição de grupamentos aminopropil, através da ação de descarboxilação de s-adenosilmetionina pela enzima s-adenosilmetionina descarboxilase (IGARASHI, K, 2010; WANG, 2012; GREENE, 2013).

Nome	Fórmula Química
Diaminopropano	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Putrescina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Cadaverina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$
Norespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Espermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Aminopropilcadaverina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$
Homoespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Norespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Termoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Aminopentilnorespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$
Espermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Bis(aminopropil)cadaverina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Aminopropilhomoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Canavalmina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Homoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Caldopentamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Aminopropilcanavalmina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Bis(aminopropil)homoespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Bis(aminobutil)norespermidina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Aminobutilcanavalmina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Aminopropilhomoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Homopentamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
N ⁵ -aminobutilhomoespermina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Caldohexamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Homocaldohexamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
Termohexamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Homotermohexamina	$\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$
Agmatina	$\text{NH}_2\text{C}(\text{NH})\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$
N ⁶ -metilagmatina	$\text{NH}_2\text{C}(\text{NCH}_3)\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$

Tabela 1. Exemplos de poliaminas biológicas e suas respectivas fórmulas químicas.

1.4.1. Sistema de transporte de poliaminas Pot como antígeno vacinal

Além do mecanismo de biossíntese, as bactérias possuem quatro genes que são responsáveis pela captação de poliaminas extracelulares (SHAH, 2008), os quais encontram-se arranjados no operon *potABCD* (figura 3), pertencendo assim a uma das maiores famílias de transportadores ativos celulares do tipo ABC (*ATP Binding Cassettes*). A Proteína Transportadora de Poliaminas D (PotD) encontra-se exposta na superfície da bactéria, com peso molecular de aproximadamente 39 kDa (FURUCHI, et al., 1991; SHAH, 2006).

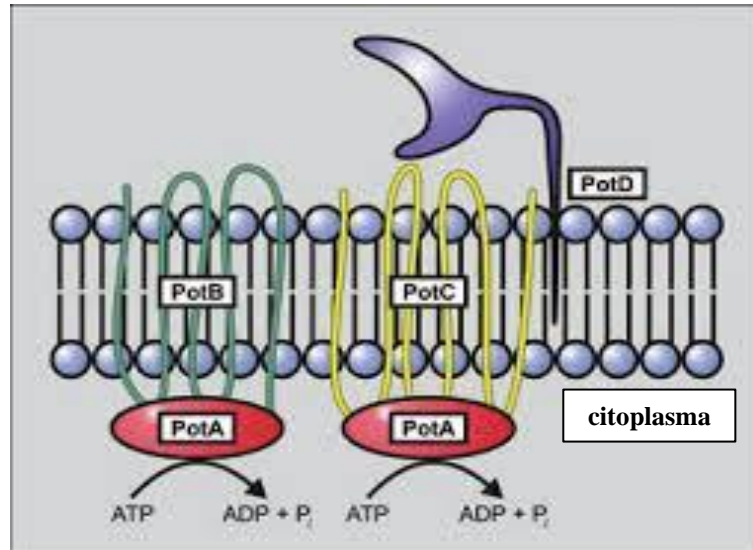


Figura 3. Esquematização do sistema de transporte ABCD de poliaminas em bactérias Gram-positivas. PotA encontra-se no domínio intracelular, fornecendo energia ao complexo; PotB e PotC, localizam-se no espaço periplasmático, portando-se como proteínas transmembranares, logo, servindo de canal para a passagem das moléculas; PotD, atua como captadora de poliaminas, as quais passaram pelo canal formado pela PotB e PotC. Fonte: Shah and Swiatlo, 2008.

Análises realizadas em *Escherichia coli*, detalham cada componente deste sistema, onde prediz-se que a proteína PotA fornece energia ao complexo, por localizar-se intracelularmente. PotB e PotC, atuam como uma espécie de canal de entrada das poliaminas para o domínio intracelular, pois se comportam como proteínas transmembranares. E, por fim, a proteína PotD, encontra-se localizada mais extracelularmente ao sistema, possuindo sítios de ligação para putrescina e espermidina, o que faz da PotD uma proteína captadora de poliaminas do meio extracelular para o meio intracelular (IGARASHI, 2001; SHAH, 2011).

Alguns estudos vacinais utilizando a proteína PotD de *Streptococcus pneumoniae* demonstram a sua relevante capacidade na proteção de camundongos colonizados pelo pneumococo, induzindo resposta imunológica e colocando-a como um potencial candidato antigênico para compor uma vacina (SHAH, 2006; CONVERSO, 2017). Devido à carência de estudos utilizando a PotD de *S. agalactiae*, este trabalho baseia-se em correlatos voltados à utilização de estratégias que abordem vacinas de DNA em modelos experimentais contra a infecção pelo *Streptococcus pneumoniae*, fornecendo assim, dados que possam servir de caminho para o entendimento da utilização da PotD como um potencial candidato vacinal no combate à infecção pelo GBS.

Shah (2006), demonstrou o potencial protetivo da imunização com a PotD recombinante purificada contra a infecção pelo *Streptococcus pneumoniae*, em modelo animal, sendo consistente aos achados de Converso *et al.* (2017), que observou a eliminação da bactéria por fagocitose, além da indução de uma resposta celular, com produção de IL-17, a qual aparentemente exerceu papel na redução da colonização. Portanto, a PotD parece apresentar-se como um potencial candidato vacinal,

devido sua capacidade em induzir resposta de anticorpos específicos, sem aparente reação cruzada com outras proteínas de pneumococos.

Para a elaboração de uma vacina é preciso atentar-se quanto à sua estabilidade e segurança, além de sua eficácia. Graças aos avanços da biotecnologia moderna, novas medidas vêm sendo estudadas para a descoberta de novos antígenos, adjuvantes e vetores ou sistemas de entrega, para que seja possível avaliar a resposta imunológica através da vacinação em sistemas hospedeiros (REIS *et al.*, 2009; DINIZ, 2010; GERMAIN, 2010). Portanto, a vacinação atua diretamente na proteção individual e coletiva de doenças imunológicas que podem ser prevenidas, de forma a controlar ou até mesmo erradicar a transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

7. CONCLUSÃO

A vacina de DNA, utilizando a PotD de GBS-V como antígeno alvo, pôde ser construída, analisada e testada em modelo animal, como uma nova abordagem de proteção contra o GBS.

Os resultados obtidos até o presente momento sugerem que a vacina de DNA, utilizando o gene *potD* de GBS-V, possui potencial para gerar resposta imunológica detectável em apenas 20 dias após administração de uma única dose, quando comparada com o grupo controle.

Análises futuras, de amostras obtidas pós imunização, poderiam explorar ainda mais o papel protetor da vacina desenvolvida contra o GBS.

Os dados da análise das demais doses não puderam ser analisados devido à instabilidade da proteína PotD de GBS em ser purificada. Com isto, uma melhor atenção deve ser dada para a PotD, quanto aos seus métodos de purificação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anuário Peixe BR da Piscicultura. Associação Brasileira da Piscicultura, 2019. PDF disponível em: <https://www.peixebr.com.br/Anuario2019/AnuarioPeixeBR2019.pdf?>, acesso em 03/07/19.

ARRUDA, C.J.M. *et al.* Revisão bibliográfica de antibióticos beta-lactâmicos. Rev. Saúde em Foco. n°11, p. 982-995, 2019.

BAE, D.H.; LANE, D.J.R.; JANSSON, P.J.; RICHARDSON, D.R. The old and new biochemistry of polyamines. Biochim Biophys Acta. v. 1862, p. 2053–2068, 2018.

BAKER, C. J.; BARRETT, F. F.; GORDON, R. C.; YPW, M. D. Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. *J Pediatr*, v. 82, p. 724-9, 1973.

BAKER, C. J.; KASPER, D. L. "Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection." *The New England journal of medicine* vol. 294,14 (1976): 753-6. doi:10.1056/NEJM197604012941404

BENCINI, A., BIANCHI, A.; GARCIA-ESPANA, E.; MICHELONI, M.; RAMIREZ, J.A. Proton coordination by polyamine compounds in aqueous solution, *Coord. Chem. Rev.* v. 188, p. 97–156, 1999.

BERARDI, A. *et al.* Group B Streptococcus Early-Onset Disease in Emilia-Romagna: Review After Introduction of a Screening-Based Approach. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 29, n. 2, p. 115–121, fev. 2010.

BOLDENOW, E. *et al.* Group b streptococcus circumvents neutrophils and neutrophil extracellular traps during amniotic cavity invasion and preterm labor. *Science immunology*. v. 1, n. 4, p. 4576, 2016.

BOTELHO, A. C. N. *et al.* "Streptococcus agalactiae carriage among pregnant women living in Rio de Janeiro, Brazil, over a period of eight years." *PloS one*, v. 13, n. 5, e0196925, 2018.

BORGHESI, A.; STRONATI, M. Strategies for the prevention of hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect.* v. 68, n. 4, p. 293–300, 2008.

BORGHESI, A. *et al.* Neonatal Group B Streptococcal Disease in Otherwise Healthy Infants: Failure of Specific Neonatal Immune Responses. *Frontiers in Immunology*. v. 8, n. 215, 2017.

BOWATER, R. O. *et al.* Epizootics of Streptococcus agalactiae infection in captive rays from Queensland, Australia. *Journal of Fish Diseases*, v. 41, p. 223–232, 2018.

BRZYCHCZY-WLOCH, M.; GOSIEWSKI, T.; BULANDA, M. Multilocus sequence types of invasive and colonizing neonatal group B streptococci in Poland. *Med Princ Pract.* v, 23, n, 4, p. 323-30, 2014.

BURNS, G.; PLUMB, J. GBS public awareness, advocacy, and prevention--what's working, what's not and why we need a maternal GBS vaccine. *Vaccine*. v. 31, n. 4, p. D58–65, 2013.

CAMPBELL, J. R. et al. Group B streptococcal colonization and serotype-specific immunity in pregnant women at delivery. *Obstet Gynecol*. v. 96, n. 4, p. 498-503, 2000.

CASTELLANO-FILHO, D. S. Et al. Detection of Group B Streptococcus in Brazilian pregnant women and antimicrobial susceptibility patterns. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 41, n. 4, p. 1047-1055, 2010.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention 2010 guidelines for the prevention of perinatal group B streptococcal disease. *Morb Mortal Wkly Rep*, v. 59, n. RR–10, p. 1–32, 2010.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Active bacterial core surveillance report, emerging infections program network, group B streptococcus, 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/gbs11.html>, acesso em 18/08/2019.

CHEN, V.L. *et al.* A maternal vaccine against group B streptococcus: past, present, and future. *Vaccine*. v. 31, n. 4, p. D13–D19, 2013.

CHIARELLA, P. *et al.* Electroporation of skeletal muscle induces danger signal release and antigen-presenting cell recruitment independently of DNA vaccine administration, *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 8, n. 11, p. 1645-1657, 2008.

COSTA, Natalie Del-Vecchio L. et al. Gestantes colonizadas pelo Streptococcus do grupo B e seus recém-nascidos: análise crítica da conduta adotada no Instituto Fernandes Figueira, Fundação Oswaldo Cruz. *Rev. paul. pediatri.*, São Paulo. v. 28, n. 2, p. 155-161, Jun 2010.

CONVERSO, T. R. *et al.* Systemic immunization with rPotD reduces Streptococcus pneumoniae nasopharyngeal colonization in mice. *Vaccine*. v. 35, n. 1, p. 149-145, 2017.

COUTINHO, *et al.* Prevenção da doença perinatal pelo estreptococo do grupo B: atualização baseada em algoritmos. Minas Gerais: FEMINA, 2011.

DELFANI, S.; BAHMANI, M.; MOHAMMADREZAEI-KHORRAMBADI, R.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Phytotherapy in Streptococcus agalactiae: An Overview of the Medicinal Plants Effective against Streptococcus agalactiae. Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR. v. 11, n. 6, p. DE01-DE02, 2017.

DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. Estudos avançados, v. 24, n. 70, 2010.

DUDLEY, H. W.; ROSENHEIM, O.; STARLING, W. W. The chemical constitution of spermine: Structure and synthesis. Biochem. J. v. 20, p. 1082-1094, 1926.

EDMOND, K. M. et al. "Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis." *Lancet (London, England)* vol. 379,9815 (2012): 547-56. doi:10.1016/S0140-6736(11)61651-6

FERREIRA, D. M. *et al.* DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein. *Journal of medical microbiology*. v. 55, n. 4, p. 375-378, 2006.

FERREIRA, D. M. et al. "Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein a is characterized by a balanced immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production." *Clinical and vaccine immunology : CVI* vol. 15,3 (2008): 499-505. doi:10.1128/CVI.00400-07.

FIOLO, Kateli et al. Taxa de infecção e sorotipos de Streptococcus agalactiae em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* v.34, n.12, p. 544-549, 2012.

FURUCHI, T. *et al.* Characteristics of the gene for a spermidine and putrescine transport system that maps at 15 min on the Escherichia coli chromosome. *J Biol Chem.* 1991;266(31):20928-20933.

GIBBS, R.; SCHRAG, S.; SCHUCHAT, A. Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet Gynecol.* v. 104, p. 1062–1076, 2004.

GERMAIN, R. N. Vaccines and the future of human immunology. *Immunity* v. 33, n. 4, p. 441–450, 2010.

GOULART, C. et al. Characterization of protective immune responses induced by pneumococcal surface protein A in fusion with pneumolysin derivatives. **PlosOne**, v. 8, n. 3, p. e59605, 2013.

GREENE, J.M. *et al.* L-arginine enhances cell proliferation and reduces apoptosis in human endometrial RL95-2 cells. *Rep Biol Endocrinol.* v. 11, n. 15, 2013.

GUIMARÃES, D.O. *et al.* Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova.* v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HAYS, C. *et al.* Changing Epidemiology of Group B Streptococcus Susceptibility to Fluoroquinolones and Aminoglycosides in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* v. 60, n.12, p. AAC.01374-16, 2016.

HANSEN, S. M; ULDBJERG, N.; KILIAN, M.; SORENSEN, U. B. S. Dynamics of Streptococcus agalactiae Colonization in Women during and after Pregnancy and in Their Infants. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 83-89, 2004.

HEATH, P. T. *et al.* “Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days.” *Lancet (London, England)* vol. 363,9405 (2004): 292-4. doi:10.1016/S0140-6736(03)15389-5.

HEATH, P. T. “An update on vaccination against group B streptococcus.” *Expert review of vaccines* vol. 10,5 (2011): 685-94. doi:10.1586/erv.11.61.

HIRAO, L. A. *et al.* Combined effects of IL-12 and electroporation enhances the potency of DNA vaccination in macaques. *Vaccine.* v. 26, n. 25, p. 3112–3120, 2008.

HUANG, L.Y. *et al.* Safety and immunogenicity of an oral DNA vaccine encoding Sip of Streptococcus agalactiae from Nile tilapia oreochromis niloticus delivered by live attenuated Salmonella typhimurium. *Fish Shellfish Immunol.* v. 38, p. 34–41, 2014.

IGARASHI, K.; ITO, K.; KASHIWAGI, K. Polyamine uptake systems in *Escherichia coli*. Res. Microbiol. v. 152, p. 271-278, 2001.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines Int. J. Biochem. Cell Biol., v. 42, n. 1, p. 39-51, 2010.

INGOLOTI, M. et al. "DNA vaccines for targeting bacterial infections." Expert review of vaccines vol. 9,7 (2010): 747-63. doi:10.1586/erv.10.57.

JOUBREL, C. et al. "Group B streptococcus neonatal invasive infections, France 2007-2012." *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* vol. 21,10 (2015): 910-6. doi:10.1016/j.cmi.2015.05.039.

KIM, Sun-Young et al. "Cost-effectiveness of a potential group B streptococcal vaccine program for pregnant women in South Africa." *Vaccine* vol. 32,17 (2014): 1954-63. doi:10.1016/j.vaccine.2014.01.062.

KASINRERK, W.; MOONSOM, S.; CHAWANSUNTATI, K. Production of Antibodies by Single DNA Immunization: Comparison of Various Immunization Routes. HYBRIDOMA AND HYBRIDOMICS. v. 21, n. 4, p. 287-293, 2002.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. Vet Clin North Am Food Anim Pract. v. 28, P. 203–216, 2012.

LE DOARE, K.; HEATH, P.T. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*. v. 31, n. 4, p. D7-12, 2013.

a- KOBAYASHI, M. *et al.* Group B Streptococcus vaccine development: present status and future considerations, with emphasis on perspectives for low and middle income countries [version 1; referees: 2 approved]. F1000Research. v. 5, n. 2355, p. 16, 2016.

b- KOBAYASHI, M. *et al.* WHO consultation on group B Streptococcus vaccine development: Report from a meeting held on 27–28 April 2016. *Vaccine*. 2016.

LEEUWENHOECK, D. A. Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, De Natis E Semine Genitali Animalculis. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. v. 12, p. 133-142; 1040–1046, 1677.

LEROUX-ROELS, G. *et al.* A randomized, observer-blind Phase Ib study to identify formulations and vaccine schedules of a trivalent group B streptococcus vaccine for use in non-pregnant and pregnant women. *Vaccine*. v. 34, n. 15, p. 1786–1791, 2016.

LI, L.; PETROVSKY, N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert review of vaccines*. v, 15, n. 3, p. 313–29, 2016.

LIN, S. M. *et al.* Status of group B streptococcal vaccine development. *Clinical and experimental vaccine research*, v. 7, n. 1, p. 76-81, 2018.

LIU, M.A. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological reviews*. v. 239, n. 1, p. 62–84, 2011.

Lu, B *et al.* “Epidemiology of Group B streptococcus isolated from pregnant women in Beijing, China.” *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* vol. 20,6 (2014): O370-3. doi:10.1111/1469-0691.12416.

HUG, L.M.A. *et al.* National, regional, and global levels and trends in neonatal mortality between 1990 and 2017, with scenario-based projections to 2030: a systematic analysis. *Lancet*, v. 7, n. 6, p. PE710-E720, 2019.

LUCKAY, A. *et al.* Effect of Plasmid DNA Vaccine Design and In vivo Electroporation on the resulting Vaccine-Specific Immune Responses in Resus Macaques. *J Virol*. v. 81, p. 5257–5269, 2007.

MADHI, S. A. *et al.* Antibody kinetics and response to routine vaccinations in infants born to women who received an investigational trivalent group B streptococcus polysaccharide CRM197-conjugate vaccine during pregnancy. *Clin Infect Dis*. v. 65, n. 11, p. 1897–1904, 2017.

MELO, S. C. C. S. et al. Prevalence of *Streptococcus agalactiae* colonization in pregnant women from the 18th Health Region of Paraná State. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, São Paulo*, v. 60, e2, 2018.

MILLER-FLEMING *et al.* Remaining Mysteries of Molecular Biology: The Role of Polyamines in the Cell. *Journal of Molecular Biology*. v. 427, p. 3389-3406, 2015.

Ministério da Saúde (BR), Saúde da criança [online]. Acesso em 08 Jan 2018. Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/>. Acesso em 09/08/2019.

MITRA, D. K. et al. Incidence and risk factors of neonatal infections in a rural Bangladeshi population: a community-based prospective study. *Journal of health, population, and nutrition*, v. 37, n. 1, p. 6, 2018.

MIYAJI, E. N. *et al.* PsaA (pneumococcal surface adhesin A) and PspA (pneumococcal surface protein A) DNA vaccines induce humoral and cellular immune responses against *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine*. v. 20, p. 805-812, 2002.

MORGAN, J.A.; COOPER, D.B. Group B *Streptococcus* And Pregnancy. [Updated 2019 Jan 17]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482443/>. Acesso em 07/07/2019.

MOYO *et al.* Stillbirth and intrauterine infection, histological chorioamnionitis and microbiological findings. *Int. J. Gynaecol. Obstet*, v. 54, n. 2, p. 115–123, 1996.

MULLER, A. E.; OOSTVOGEL, P. M.; STEEGERS, E. A. P.; JOEP DÖRR, P. Morbidity related to maternal group B streptococcal infections. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. v, 85, p. 1027–1037, 2006.

NUCCITELLI, A. et al., (2015). Group B *Streptococcus* vaccine: state of the art. *Therapeutic advances in vaccines*, 3(3), 76–90. <https://doi.org/10.1177/2051013615579869>.

NUR-NAZIFAH, M. *et al.* Development and efficacy of feed-based recombinant vaccine encoding the cell wall surface anchor family protein of *Streptococcus agalactiae* against streptococcosis in *Oreochromis sp.* *Fish Shellfish Immunol.* v. 37, p. 193–200, 2014.

PHARES, C. R. *et al.* Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in the United States, 1999-2005. *JAMA*, v. 299, n. 17, p. 2056-2065, 2008.

PEGG, A. E. "Functions of Polyamines in Mammals." *The Journal of biological chemistry* vol. 291,29 (2016): 14904-12. doi:10.1074/jbc.R116.731661.

POGERE, A. *et al.* Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes atendidas em ambulatório de pré-natal. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro , v. 27, n. 4, p. 174-180, Apr. 2005 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032005000400003&lng=en&nrm=iso>.

RAJCANI, J.; MOSKO, T.; REZUCHOVA, I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? *Rev Med Virol.* v. 15, n. 5, p. 303–325, 2005.

RAMANI, D.; DE BANDT, J.P.; CYNOBER, L. Aliphatic polyamines in physiology and diseases *Clin. Nutr.* v. 33, p. 14-22, 2014.

REIS, C. *et al.* Biotecnologia para saúde humana: Tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica. *BNDS Setorial*, Rio de Janeiro, n.29, p. 359-392, mar. 2009.

REZENDE, Cátia *et al.*, Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* na secreção vaginal e anal de gestantes de um município do noroeste paulista. *Rev. Uniara*, v.13, n.2, 2010.

ROSANO, G. L.; EDUARDO, A. C.. "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges." *Frontiers in microbiology* vol. 5 172. 17 Apr. 2014, doi:10.3389/fmicb.2014.00172

ROSENHEIM, O. The isolation of spermine phosphate from semen and testis. *Biochem. J.* v. 18, p. 1253 e 1263, 1924.

RCOG - Royal College of Obstetricians and Gynaecologists. (2012). Disponível em: https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/strategy-and-annual-reports/annual_report_2011.pdf, acesso em 18/08/2019.

SALES, N. S. et al. In vivo electroporation enhances vaccine-mediated therapeutic control of human papilloma virus-associated tumors by the activation of multifunctional and effector memory CD8⁺ T cells. *Vaccine*. 2017 Dec 19;35(52):7240-7249.

SARDESAI, N. Y., & WEINER, D. B. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Current opinion in immunology*, 23(3), 421–429, 2011.

SCHIPPER, R.G.; PENNING, L.C.; VERHOFSTAD, A. A. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin Cancer Biol* v. 10, p. 55–68, 2000.

SCHUCHAT, A. “Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms.” *Clinical microbiology reviews*, v. 11, n. 3, p. 497-513, 1998.

SEALE, A. et al. “Estimates of the burden of group b streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths and children.” *Clinical Infectious Diseases*, v. 65, n. 2, p. S200–S219, 2017.

SHAH, P. *et al.* Polyamine biosynthesis and transport mechanisms are crucial for fitness and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*. v. 157, n. Pt2, p. 504-515, 2011.

SHAH, P.; SWIATLO, E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Molecular Microbiology*. v. 68, n. 1, p. 4–16, 2008.

SHAH, P.; SWIATLO, E. Immunization with Polyamine Transport Protein PotD Protects Mice against Systemic Infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* v. 74, n. 10, p. 5888, 2006.

SCHARAG, S. J. *et al.* Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *The New England Journal of Medicine*. v. 342, n. 1, p. 15–20, 2000.

SIMONSEN, K. A. *et al.* Early-onset neonatal sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*. v, 27, p. 21–47, 2014.

STOLL, B. J.; HANSEN, N. I.; SÁNCHEZ, P. J. et al. Early Onset Neonatal Sepsis: The Burden of Group B Streptococcal and *E. coli* Disease Continues. *Pediatrics*, v. 127, n. 5, p. 817-826, 2011.

System That Maps at 15 min on the Escherichia coli Chromosome. *J. Biol. Chem.* v. 266, n. 31, p. 20928–20933, 1991.

URIEL, B. The early history of polyamine research, *Plant Physiol. Biochem.* v. 48, p. 490–495, 2010.

VERSTRAETE, E. H. et al. Prediction models for neonatal health care-associated sepsis: a meta-analysis. *Pediatrics.* v. 135, n. 4, p. e1002–e1014, 2015.

VERANI, J. R.; McGEEL, L.; SCHRAG, S. J. Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of perinatal group B streptococcal disease - revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep.* v. 59, n. RR-10, p. 1-36, 2010.

VOJTEK, I. et al. Maternal immunization: where are we now and how to move forward? *Annals of Medicine.* v. 50, n. 3, p. 193-208, 2018.

VORNHAGEN, J.; WALDORF, K.M.A.; RAJAGOPAL, L. Perinatal group b streptococcal infections: virulence factors, immunity and prevention strategies. *Trends Microbiol.* v. 25, n. 11, p.919-931, 2017.

WANG, S. Y. et al. Spermine attenuates the action of the DNA intercalator, actinomycin D, on DNA binding and the inhibition of transcription and DNA replication. *PloS one.* v. 7, n. 11, p. e47101, 2012.

WARE, D. et al. “Involvement of potD in *Streptococcus pneumoniae* polyamine transport and pathogenesis.” *Infection and immunity* vol. 74,1 (2006): 352-61. doi:10.1128/IAI.74.1.352-361.2006

WHOa – World Health Organization. Immunization, Vaccines and Biologicals S. Group B *Streptococcus* infection causes an estimated 150,000 preventable stillbirths and infant deaths every year. [Internet]. World Health Organization; 2017. Disponível em: https://www.who.int/immunization/newsroom/press/news_group_b_strep_stillbirths_infant_deaths_2017/en/. Acesso em 01/08/2019.

WHO – World Health Organization. Newborns, 2017. Disponível em: https://www.who.int/immunization/newsroom/press/news_group_b_strep_stillbirths_infant_deaths_2017/en/, acesso em 03/07/2020 (obs: salvei no bloco de notas do MacBook). Acesso em 30/01/2019.