

**NAYARA FERNANDA BARROS DOS SANTOS**

**Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra *Streptococcus agalactiae*  
baseada em antígenos proteicos**

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

São Paulo  
2020

**NAYARA FERNANDA BARROS DOS SANTOS**

**Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra *Streptococcus agalactiae*  
baseada em antígenos proteicos**

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

Área de concentração: Biotecnologia

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

Versão original

São Paulo  
2020

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Santos, Nayara Fernanda Barros dos  
Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra  
Streptococcus agalactiae baseada em antígenos  
proteicos / Nayara Fernanda Barros dos Santos;  
orientadora Rita de Cássia Café Ferreira. -- São  
Paulo, 2020.  
117 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Streptococcus. 2. Vacinas. 3. Proteínas  
recombinantes. 4. Fagocitose. 5. Imunização passiva.  
I. Ferreira, Rita de Cássia Café, orientador. II.  
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
**Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia**  
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): **Nayara Fernanda Barros dos Santos**

Título da Tese: **Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra *Streptococcus agalactiae* baseada em antígenos proteicos**

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

**Aprovado(a)**                       **Reprovado(a)**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra Streptococcus agalactiae baseada em antígenos proteicos*", registrado sob o protocolo nº **41/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **01/06/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Rita de Cássia Café Pereira**

- Departamento: *Microbiologia*

- Membros da Equipe: *Nayara Fernanda Barros dos Santos (Pós-graduando), Helic Moreira Passos (Pós-graduando), Dalva Adelina da Silva (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [www.icb.usp.br/ceuo](http://www.icb.usp.br/ceuo). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Development of a vaccine strategy against Streptococcus agalactiae based on protein antigens*", protocol nº **41/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **6/1/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Rita de Cássia Café Pereira**

- Team members: *Nayara Fernanda Barros dos Santos (Graduate Student), Helic Moreira Passos (Graduate Student), Dalva Adelina da Silva (Graduate Student)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Balb/c</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>6-8 semanas/weeks</i>	225
	<i>C57bl/6j</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>6-8 semanas/weeks</i>	110
	<i>Swiss</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>6-8 semanas/weeks</i>	282

São Paulo, 30 de junho de 2017.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes  
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento  
Secretário CEUA-ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.192.2018

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº 41/2017/CEUA, aprovado em 01/06/2017, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo "*Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra Streptococcus agalactiae baseada em antígenos proteicos*", de responsabilidade da Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira, do Departamento de Microbiologia, para finalização de experimentos necessários à conclusão da tese de doutorado em andamento:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Camundongo	C57BL/6	Fêmeas	6-8 semanas	150

São Paulo, 20 de dezembro de 2018.

*Luciane Valéria Sita*

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e proteção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira, por te me aceitado no seu grupo, bem como ao Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, por todo o apoio científico.

À Dra. Eliane Namie Miyagi pelas sugestões.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas da USP, pessoas únicas e maravilhosas que foram preciosamente colocadas na minha vida.

Ao Edu, que sempre me ajudou a resolver todos os perrengues.

Aos meus colegas do grupo Strepto, Lukas, Fagner, Dalva, Hélic e Marco.

Ao Samuel, pela amizade, por ter cuidado da “minha” orquídea e pelo apoio com os “Blacks”!

Às minhas madrinhas lindas, Aléxia e Jamile, e às meninas super poderosas que fizeram o meu casamento ser tão lindo!! Nathy, Mari, Karine, Paty, Tatá, Bruna e Carol!!

À Deni, por toda a amizade, incentivo e leitura desta tese.

Agradeço especialmente à Aléxia Adriane, por toda a amizade e ajuda no processo de depósito desta tese.

Aos meus pais, Neiva e Marcos, por sempre me apoiarem.

Ao meu marido Zaqueu, pela compreensão e companheirismo em todos os momentos desta caminhada acadêmica.

## RESUMO

SANTOS, NFB. **Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra *Streptococcus agalactiae* baseada em antígenos proteicos.** 2020. 117 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

*Streptococcus agalactiae* ou estreptococo do grupo B (GBS), é uma bactéria gram-positiva dividida em dez sorotipos distintos (Ia, Ib a IX) que coloniza os tratos vaginal e gastrointestinal de aproximadamente 30% das mulheres em todo o mundo. O GBS é a principal causa de infecções invasivas em recém-nascidos, causando sepse, pneumonia e meningite. A principal estratégia para prevenir a infecção por GBS em recém-nascidos inclui o uso de antibioticoterapia intraparto, que não previne doenças de início tardio e pode favorecer a seleção de cepas bacterianas resistentes. Ainda não existem vacinas contra o patógeno aprovadas para uso humano. Proteínas de superfície conservadas caracterizam potenciais antígenos que podem ser alvos de anticorpos e ativação de células fagocíticas por opsonização. Neste trabalho, nós utilizamos duas proteínas recombinantes derivadas de GBS, Sip (proteína de superfície imunogênica) e BibA (adesina bacteriana imunogênica), e avaliamos o potencial papel protetor dos anticorpos antígeno-específicos induzidos após imunização por via parenteral ou de mucosa em camundongos Balb/c e C57BL/6. A proteína recombinante Sip não apresentou estabilidade suficiente para ser testada como antígeno vacinal. Ensaio *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a formulação vacinal contendo BibA combinada a diferentes adjuvantes induziu altos títulos de IgG sérico e/ou IgA secretada, levando ao aumento da fagocitose de células GBS e redução da invasão de células epiteliais. Uma das formulações vacinais baseadas em BibA foi capaz de induzir proteção contra a colonização vaginal e desafio parenteral letal com GBS-V. Além disso, imunização passiva com soro de camundongos previamente vacinados conferiu proteção a camundongos naïve desafiados com GBS-V. Em conjunto, os presentes dados demonstraram que o antígeno BibA representa um candidato vacinal promissor para prevenir a infecção por GBS-V.

**Palavras-chave:** *Streptococcus*. Vacinas. Proteínas recombinantes. Fagocitose. Imunização passiva.



## ABSTRACT

SANTOS, NFB. **Development of a vaccine strategy against *Streptococcus agalactiae* based on protein antigens.** 2020. 117 p. Thesis (Ph. D. thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

*Streptococcus agalactiae* or group B Streptococcus (GBS) is a gram-positive bacterium divided into ten distinct serotypes (Ia, Ib to IX) that colonizes vaginal and rectal tracts of approximately 30% of the women worldwide. GBS is the main cause of invasive infections in newborns, causing sepsis, pneumoniae and meningitis. The main strategy to prevent GSB infection in newborns includes the use of intrapartum antibiotic therapy, that do not prevent late-onset diseases and may select resistant bacterial strains. We still do not have any vaccinal formulation against the pathogen approved for human use. Conserved surface proteins are potential antigens that could be targets for antibodies and activation of phagocytic cells by opsonization. In this work, we used two recombinant proteins derived from GBS, Sip (immunogenic surface protein) and BibA (immunogenic bacterial adhesin) and evaluated the potential protective role of the induced antigens-specific antibodies after parenteral or mucosal immunizations to BALB/c and C57BL/6 mice. Recombinant protein Sip did not show sufficient stability to be tested as a vaccine antigen. *In vitro* and *in vivo* assays demonstrated that a vaccine formulation containing BibA combined with adjuvant induced high titers of serum IgG and/or secreted IgA leading to enhanced phagocytosis of GBS cells and reduced invasion of epithelial cells. One BibA-based vaccine formulation was capable of inducing protection against vaginal colonization and a lethal parenteral challenge with GBS-V. Passive immunization with serum collected from vaccinated mice conferred protection to naïve mice challenged with GBS-V. Taken together, the present data demonstrated that the BibA antigen represents a promising vaccine target for preventing GBS-V infection.

**Keywords:** *Streptococcus*. Vaccine. Recombinant protein. Phagocytosis. Passive immunization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Prevalência de colonização por Estreptococos do grupo B por país.....	21
<b>Figura 2.</b> Fatores de virulência de GBS e as suas funções na transição da colonização para doença invasiva.....	23
<b>Figura 3.</b> Esquematização do processo de exfoliação epitelial induzido pela interação do GBS e integrinas da célula hospedeira.....	26
<b>Figura 4.</b> Status do desenvolvimento dos candidatos vacinais atuais para <i>S. agalactiae</i> .....	30
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do protocolo de colonização vaginal com GBS utilizado em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6.....	56
<b>Figura 6.</b> Esquematização das proteínas BibA e Sip.....	58
<b>Figura 7.</b> Amplificação e subclonagem de fragmentos do gene <i>bibA</i> .....	59
<b>Figura 8.</b> Clonagem do gene <i>sip</i> em vetores de expressão.....	59
<b>Figura 9.</b> Amplificação do gene <i>sip</i> a partir de vetores recombinantes.....	60
<b>Figura 10.</b> Análise de restrição de vetores obtidos após a clonagem do gene <i>sip</i> .....	61
<b>Figura 11.</b> Teste de expressão da proteína Sip em <i>B. subtilis</i> .....	62
<b>Figura 12.</b> Teste de expressão da proteína Sip por linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> .....	62
<b>Figura 13.</b> Avaliação da expressão da proteína Sip nas frações solúvel e insolúvel dos extratos celulares.....	63
<b>Figura 14.</b> Teste de expressão da proteína Sip.....	64
<b>Figura 15.</b> Expressão da proteína Sip recombinante nas frações solúveis (S) e insolúveis (I) de extratos bacterianos após cultivo em meios LB e TB.....	64
<b>Figura 16.</b> Teste de expressão da proteína Sip.....	65
<b>Figura 17.</b> Teste de expressão da proteína BibA em <i>E. coli</i> BL21(DE3) e <i>E. coli</i> pLysS.....	66
<b>Figura 18.</b> Expressão da proteína BibA em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	67
<b>Figura 19.</b> Purificação da proteína Sip a partir da fração solúvel de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	67
<b>Figura 20.</b> Purificação da proteína Sip após cromatografia de gel filtração.....	68
<b>Figura 21.</b> Purificação da proteína Sip por cromatografia de troca aniônica.....	69
<b>Figura 22.</b> Purificação por cromatografia de troca aniônica da proteína Sip.....	69
<b>Figura 23.</b> Purificação da proteína Sip obtida após reenovelamento e cromatografia de afinidade ao níquel.....	70
<b>Figura 24.</b> Purificação da proteína Sip obtida a partir da fração insolúvel por cromatografia de gel filtração.....	70

<b>Figura 25.</b> Purificação da proteína BibA (86 kDa), obtida a partir da fração solúvel em <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	71
<b>Figura 26.</b> Caracterização da adesina bacteriana imunogênica recombinante BibA.....	72
<b>Figura 27.</b> Avaliação dos títulos de anticorpos IgG gerados a partir das imunizações com as proteínas Sip solúvel ( $\alpha$ -Sip SOL), Sip obtida por reenovelamento ( $\alpha$ -Sip REF) ou contra GBS-V ( $\alpha$ -GBS-V).....	73
<b>Figura 28.</b> Ensaio de ELISA para avaliação dos títulos de anticorpos IgG gerados a partir da imunização com a proteína BibA solúvel.....	74
<b>Figura 29.</b> Análise das proteínas purificadas por meio de <i>western blot</i> .....	75
<b>Figura 30.</b> Ensaio de ELISA para avaliação do reconhecimento da proteína Sip.....	76
<b>Figura 31.</b> Reatividade de soros policlonais contra o antígeno BibA nativo ou BibA desnaturado por calor.....	76
<b>Figura 32.</b> Caracterização da resposta de anticorpos gerada após imunização com a proteína rBibA.....	78
<b>Figura 33.</b> Afinidade de anticorpos anti-BibA com o antígeno BibA purificado.....	79
<b>Figura 34.</b> Respostas de IgA BibA-específicas.....	80
<b>Figura 35.</b> Esquema de análise do perfil de proliferação de linfócitos B, T CD4 e T CD8.....	81
<b>Figura 36.</b> Ensaio e linfoproliferação.....	82
<b>Figura 37.</b> Ensaio de biofilme em microplaca utilizando GBS do sorotipo Ia e sorotipo V...83	
<b>Figura 38.</b> Ensaio de biofilme em microplaca utilizando GBS do sorotipo Ia e sorotipo V...84	
<b>Figura 39.</b> ELISA de células inteiras realizado com diferentes sorotipos de GBS.....85	
<b>Figura 40.</b> Avaliação da capacidade de reconhecimento de GBS-V pelos soros policlonais gerados por meio de imunização de camundongos Balb/c com as proteínas recombinantes Sip e BibA.....86	
<b>Figura 41.</b> Ensaio de invasão de células A549 por GBS-V.....88	
<b>Figura 42.</b> Avaliação da imunidade protetora dos soros gerados em camundongos imunizados com as formulações de vacinais contendo rBibA.....89	
<b>Figura 43.</b> Curva de sobrevivência de camundongos C57BL/6 após desafio intraperitoneal com diferentes doses de GBS-V ( $10^8$ , $10^5$ e $10^4$ UFC).....90	
<b>Figura 44.</b> Imunidade protetora frente ao desafio letal por administração i.p. de GBS-V.....91	
<b>Figura 45.</b> Padronização do protocolo de colonização vaginal de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6.....92	
<b>Figura 46.</b> Imunidade protetora à colonização vaginal por GBS-V.....93	

**Figura 47.** Proteção passiva conferida à colonização vaginal por GBS usando soros imunes anti-rBibA.....94

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes <i>sip</i> e <i>bibA</i> a partir de sequências molde do sorotipo V de <i>S. agalactiae</i> .....	38
<b>Tabela 2.</b> Reagentes e respectivas concentrações para preparo das reações de amplificação dos fragmentos de DNA por PCR.....	39
<b>Tabela 3.</b> Meios de cultura HS e LS para preparo de <i>Bacillus subtilis</i> quimiocompetentes....	41
<b>Tabela 4.</b> Diferentes condições de indução da expressão da proteína Sip.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
ACOG	Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância simples)
APC	Células apresentadoras de antígenos
BibA	<i>Bacterial immunogenic adhesin</i> (Adesina bacteriana imunogênica)
BM	<i>Biofilm medium</i> (Meio para biofilme)
BV	<i>Brilliant violet</i> (Violeta brilhante)
C4bp	Proteína ligadora de C4
CD	<i>Circular dichroism</i> (Dicroísmo circular)
CD4/CD8	<i>Cluster of differentiation 7/8</i> (Grupo de diferenciação)
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CPS	<i>Capsular polysaccharide</i> (polissacarídeo capsular)
DL	Dose letal
DMEM	Meio Eagles Modificado
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DO	Densidade ótica
DP	Desvio padrão
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EMT	<i>Epithelial–mesenchymal transition</i> (transição epitelial para mesenquimal)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima)
EOD	<i>Early-onset disease</i> (doença de início precoce)
ETEC	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FCS	<i>Forward scatter</i>
Fmo	<i>Fluorescence minus one control</i>
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i> (Tecido linfoide associado ao intestino)

GBS	Group B <i>Streptococcus</i> (Estreptococo do grupo B)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (Solução salina equilibrada de Hank)
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HS	<i>High salt</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IAP	<i>Intrapartum Antibiotic Prophylaxis</i> (Profilaxia antibiótica intraparto)
IFN	Interferon
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
InvA	Invasina de <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
IPTG	<i>Isopropyl <math>\beta</math>-d-1-thiogalactopyranoside</i>
LB	Lysogeny broth
LmbP	<i>Laminin-binding protein</i>
LOD	<i>Late-onset disease</i> (Doença de início tardio)
LrrG	<i>Leucine-rich repeat protein</i>
LS	<i>Low salt</i>
LT	<i>Heat labile toxin</i>
MIC	Concentração inibitória mínima
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
NALT	<i>Nasal-associated lymphoid tissue</i> (Tecido linfoide associado à nasofaringe)
NK	<i>Natural killer cells</i> (células matadoras profissionais)
OPD	Ortofenilenodiamina
OPKA	<i>Opsonophagocytic Killing Assay</i> (Ensaio de morte por opsonofagocitose)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PCL	Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)
$\gamma$ -PGA	$\gamma$ -poliglutâmico
PGA	Poli (ácido glicólico)
PHB	Poli (hidroxibutirato)
PLA	Ácido polilático

PLGA	Poli (ácido láctico-co-glicólico)
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonylfluoride</i>
ScpB	C5a peptidase de GBS)
SFB	Soro fetal bovino
sIgA	Imonoglobulina A secretada
Sip	<i>Surface immunogenic protein</i> (Proteína imunogênica de superfície)
SSC	<i>Side scatter</i> (Dispersão lateral)
THB	<i>Todd Hewitt Broth</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
TLR	<i>Toll like receptors</i> (Receptores do tipo Toll)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
UFC	Unidade formadora de colônia



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
cm	Centímetro
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
$\theta$	Teta
g	Gramma
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{m}$	Micromêtro
mg	Miligrama
$\mu\text{L}$	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
M	Molar
kDa	Kilodalton
L	Litro
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
N	Normal
pb	Pares de bases
pmol	Picomolar
pH	Potencial de hidrogênio
psi	<i>Pound force per square inch</i> (libra força por polegada quadrada)
rpm	Rotação por minute
U	Unidade
v	Volume
xg	Força centrífuga relativa (RCF) ou força gravitacional

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1 ESTREPTOCOCO DO GRUPO B.....	20
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	21
1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	23
1.4 PROFILAXIA INTRAPARTO.....	27
1.5 VACINAS CONTRA GBS.....	28
<b>1.5.1 Licenciamento de formulações vacinais para GBS</b> .....	<b>30</b>
<b>1.5.2 Vias de imunização e adjuvantes</b> .....	<b>32</b>
<b>1.5.3. Imunidade ativa e passiva</b> .....	<b>34</b>
1.6 JUSTIFICATIVA PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ABORDAGEM VACINAL.....	35
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1 CLONAGEM DOS GENES <i>sip</i> e <i>bibA</i> de <i>S. agalactiae</i> .....	38
<b>3.1.2 Recuperação do gene sintético <i>bibA</i></b> .....	<b>39</b>
<b>3.1.3 Transformação e seleção dos clones positivos</b> .....	<b>40</b>
3.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Sip EM <i>Bacillus subtilis</i> .....	40
<b>3.2.1 Preparo de <i>Bacillus subtilis</i> competentes</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2.2 Teste de expressão em <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	<b>41</b>
3.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>Escherichia coli</i> .....	42
<b>3.3.1 Teste de expressão das proteínas recombinantes</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.2 Avaliação da solubilidade da proteína expressa</b> .....	<b>42</b>
<b>3.3.3 Escalonamento da expressão das proteínas recombinantes</b> .....	<b>43</b>
<b>3.3.4 Purificação de corpos de inclusão e reenovelamento (<i>refolding</i>)</b> .....	<b>44</b>
3.4 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	44
<b>3.4.1 Purificação com resina de níquel</b> .....	<b>44</b>
<b>3.4.2 Cromatografia de afinidade em sistema semi-automatizado</b> .....	<b>45</b>
3.5 CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO BibA.....	45
<b>3.5.1 Dicroísmo circular</b> .....	<b>46</b>

3.5.2 Determinação da estabilidade térmica em sistema Tycho .....	46
3.6. PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL E IMUNIZAÇÃO.....	46
3.6.1 Produção de soro policlonal.....	47
3.6.2 Imunização de camundongos da linhagem C57BL/6 .....	47
3.7 RECONHECIMENTO DOS ANTÍGENOS PROTEICOS.....	48
3.7.1 Reconhecimento dos antígenos por imunodeteção em placa (ELISA) .....	48
3.7.2 Reconhecimento das proteínas Sip e BibA por <i>western blot</i> .....	49
3.7.3 Ensaio de afinidade antígeno-anticorpo .....	50
3.8. PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS <i>in vitro</i> COM GBS.....	50
3.8.1 Formação de biofilme.....	50
3.8.2 Imunofluorescência .....	51
3.8.3 Opsonofagocitose .....	52
3.8.4 Invasão de células epiteliais .....	52
3.9 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR.....	53
3.9.1 Obtenção e processamento de células do baço.....	53
3.9.2 Obtenção e processamento de células do linfonodo.....	54
3.9.3 Ensaio de marcação de células para citometria.....	54
3.10 DESAFIO LETAL E COLONIZAÇÃO VAGINAL.....	55
3.10.1 Ativação da virulência de GBS-V .....	55
3.10.2 Desafio letal .....	55
3.10.3 Colonização vaginal.....	56
3.10.4 Proteção por imunidade passiva .....	57
3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	57
4. RESULTADOS .....	58
4.1 CLONAGEM EM VETORES DE EXPRESSÃO.....	58
4.2 EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS VACINAIS Sip E BibA.....	61
4.2.1 Teste de expressão da proteína Sip e <i>B. subtilis</i> 1012 .....	61
4.2.2 Teste de expressão da proteína Sip em <i>E. coli</i> .....	62
4.2.3 Produção da proteína Sip em linhagens de <i>E. coli</i> .....	63
4.2.4 Teste de expressão da proteína BibA em <i>E. coli</i> .....	65
4.2.5 Produção da proteína BibA em <i>E. coli</i> .....	66
4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	67
4.3.1 Purificação da proteína Sip .....	67
4.3.2 Purificação da proteína BibA .....	70

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA BibA.....	71
4.5 PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL EM CAMUNDONGOS Balb/c.....	72
<b>4.5.1 Soro policlonal anti-Sip .....</b>	<b>72</b>
<b>4.5.2 Soro produzido contra a proteína BibA .....</b>	<b>74</b>
4.6 RECONHECIMENTO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE GBS.....	74
<b>4.6.1 Imunodeteção em membranas (<i>Western blot</i>) .....</b>	<b>74</b>
<b>4.6.2 Imunodeteção em placa (ELISA) .....</b>	<b>75</b>
4.7 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM FORMULAÇÕES VACINAIS.....	77
<b>4.7.1 Avaliação da resposta imune humoral .....</b>	<b>77</b>
<b>4.7.2 Avidéz dos anticorpos gerados .....</b>	<b>78</b>
<b>4.7.3 Produção de IgA .....</b>	<b>79</b>
4.8 RESPOSTA CELULAR.....	80
4.9 ENSAIOS <i>in vitro</i> COM GBS.....	83
<b>4.9.1 Biofilme.....</b>	<b>83</b>
<b>4.9.2 Reconhecimento de cepas de GBS.....</b>	<b>84</b>
<b>4.9.3 Imunofluorescência .....</b>	<b>85</b>
<b>4.9.4 Invasão de células epiteliais .....</b>	<b>87</b>
<b>4.9.5 Opsonofagocitose .....</b>	<b>89</b>
4.10 DESAFIO DE MODELOS ANIMAIS.....	90
<b>4.10.1 Desafio letal .....</b>	<b>90</b>
<b>4.10.2 Desafio de colonização vaginal .....</b>	<b>91</b>
<b>4.10.3 Imunidade passiva .....</b>	<b>93</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ESTREPTOCOCO DO GRUPO B

O *Streptococcus agalactiae*, também conhecido como Estreptococo do grupo B (GBS), é uma bactéria gram-positiva,  $\beta$ -hemolítica, anaeróbia facultativa, com morfologia de cocos, dispostos em pares ou pequenas cadeias (FALLON, 1974). A classificação sorológica do GBS é baseada no antígeno polissacarídeo capsular específico, contando com 10 variantes de sorotipos capsulares, sendo estes classificados em Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX, todos capazes de causar doenças invasivas (SLOTVED et al., 2007; KAPATAI et al., 2017).

O GBS foi isolado pela primeira vez por Nocard (1887), sendo reconhecido por décadas como o agente etiológico da mastite bovina, mas não como causador de infecções em humanos (NUCCITELLI; RINAUDO; MAIONE, 2015). Em 1935, cepas foram isoladas pela primeira vez em humanos, caracterizadas como bactérias colonizadoras de mulheres grávidas (LANCEFIELD; HARE, 1935). Na década de 1970, o GBS emergiu como a principal causa infecciosa de morbidade e mortalidade neonatal nos Estados Unidos, resultando em quadros de septicemia e meningite em neonatos e em crianças de até 3 meses de idade. Em 1980, estimou-se uma taxa e mortalidade de 20–25%, bem como a presença de sequelas neurológicas permanentes na maior parte dos sobreviventes (SCHUCHAT, 1999).

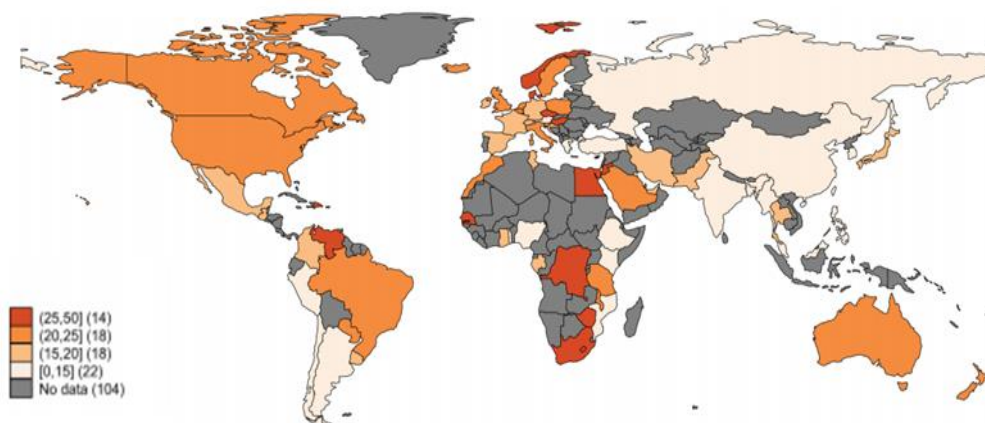
Atualmente, o GBS é considerado um dos mais importantes riscos para o desenvolvimento de doença neonatal, sendo a principal causa de sepsis e meningite em recém-nascidos, quadros associados principalmente a infecções pelos sorotipos Ia, III e V (SHET; FERRIERI, 2004; HEATH; SCHUCHAT, 2007; EDMOND et al., 2012). Além disso, o GBS está associado a altas taxas de doenças invasivas em adultos, principalmente em pacientes idosos, imunocomprometidos, negros e indivíduos com diabetes, câncer, cirrose ou com infecção por HIV (HIGH; EDWARDS; BAKER, 2005; SKOFF et al., 2009), resultando em quadros de bacteremia, infecções de pele e subcutâneas, pneumonia, endocardite, meningite e inflamação do trato urogenital (REINSCHIED et al., 2001; STUPAK et al., 2010).

A sepsis neonatal causada por GBS pode ocorrer de duas formas clínicas distintas. A primeira delas, denominada doença de início precoce (do inglês, *early-onset disease* – EOD), ocorre dentro da primeira semana de vida do recém-nascido, como resultado da infecção intrauterina ou intraparto (transmissão vertical), sendo caracterizada principalmente por quadros de pneumonia e septicemia. A segunda, denominada doença de início tardio (do inglês, *late-onset disease* – LOD), ocorre até o terceiro mês de vida e geralmente envolve a

evolução do quadro clínico para meningite (KOLTER; HENNEKE, 2017). As origens da LOD permanecem indefinidas, no entanto, alguns trabalhos sugerem que o leite materno constitua uma possível fonte de contaminação por GBS (ZIMMERMANN; GWEE; CURTIS, 2017), assim como a transmissão do patógeno dentro do ambiente hospitalar (JAUNEIKAITE et al., 2018).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

A prevalência e a distribuição dos sorotipos de GBS diferem entre as regiões geográficas, populações étnicas e apresentações clínicas (SCHUCHAT, 1998). As taxas de colonização por GBS em gestantes saudáveis é de até 35%, variando de acordo com as condições socioeconômica, cultural e demográfica, como pode ser analisado na figura 1 (HANSEN et al., 2004; RUSSELL et al., 2017b). Devido à grande variabilidade de aspectos envolvidos nas taxas de colonização por GBS, a determinação da distribuição dos sorotipos circulantes em diferentes regiões geográficas gera dados de extrema relevância no contexto do desenvolvimento de profilaxias eficientes contra este microrganismo.



**Figura 1.** Prevalência de colonização por Estreptococos do grupo B por país.

**Fonte:** RUSSELL et al., 2017.

Um estudo realizado na Eslovênia, com 830 mulheres grávidas, apresentou uma taxa de colonização por GBS superior a 23% (FIŠER et al., 2001). Na Nova Zelândia, de 240 mulheres testadas, 22% (52) estavam colonizadas por GBS. Os sorotipos predominantes foram o III (29%), Ia (21%), Ib (20%) e V (20%) (GRIMWOOD et al., 2002). Na Alemanha, verificou-se uma alta prevalência de colonização por GBS, atingindo taxas de 16%, tanto em

mulheres gestantes quanto em não gestantes. Dentre os 75 isolados clínicos, o sorotipo III foi o mais prevalente, com taxas de colonização de 28% (BRIMIL et al., 2006).

No sudeste da Ásia os índices são de 11,1%, 22,4% na África, 24% nas Américas e a 19% na Europa (KWATRA et al., 2016; SAHA et al., 2017). Em relação à distribuição dos sorotipos de GBS entre mulheres grávidas da região do Gabão, África Central, 30,3% apresentaram colonização pelo sorotipo V, 27,5% pelo sorotipo III e 22,9% pelo sorotipo Ib (BELARD et al., 2015). Em Beijing, China, estudos realizados a partir da análise de *swabs* vaginal e retal coletados de 2.850 gestantes apontaram uma taxa de colonização de 7,1%, sendo o sorotipo III mais prevalente, seguido pelos sorotipos Ia, V, Ib e II (LU et al., 2014).

No Brasil, em um estudo realizado pela Universidade Federal de Santa Catarina, amostras de 203 mulheres grávidas foram coletadas e testadas para a presença de GBS, resultando em 19,7% de positividade (SCHORNER, 2014). Dutra e colaboradores (2014) verificaram a distribuição dos sorotipos de GBS em relação às diferentes regiões geográficas do Brasil. Dentre os 434 isolados, os sorotipos mais predominantes foram os sorotipos Ia, com 120 isolados (27,6%), II com 83 isolados (19,1%), Ib com 81 isolados (18,7%) e V com 59 isolados (13,6%), no entanto, a distribuição dos sorotipos mais prevalentes dentre as diferentes regiões do país foi bastante variável (DUTRA et al., 2014).

As taxas de mortalidade causadas por GBS variam no mundo todo, sendo a infecção precoce responsável por uma taxa de mortalidade de 4% em países desenvolvidos, chegando a 27% na África. Já a infecção de início tardio apresenta uma taxa de mortalidade de 4% a 9% (MADRID et al., 2017), resultando em sequelas neurológicas e cognitivas permanentes em cerca de 30% dos sobreviventes à infecção, implicando no atraso global no desenvolvimento, surdez, paralisia cerebral e espasticidade (DAGNEW et al., 2012; LIBSTER et al., 2012; MATSUBARA; HOSHINA; SUZUKI, 2013). Além disso, infecções causadas por GBS são observadas com mais frequência em recém-nascidos prematuros (25,2%), do que em neonatos nascidos no tempo correto (7,2%) (AL-SWEIH et al., 2004).

De acordo com os dados levantados, pode-se afirmar que o GBS é um colonizador frequente do trato reto-vaginal. Além disso, os estudos epidemiológicos realizados em diferentes áreas geográficas apresentam dados similares de distribuição e prevalência dos sorotipos (PHARES, 2008; LE DOARE et al., 2017), dados estes que devem ser utilizados como base para o desenvolvimento de propostas vacinais voltadas para a prevenção de infecções causadas por GBS.

### 1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

As proteínas do GBS responsáveis pela colonização, evasão do sistema imune e invasão de células do hospedeiro ainda são mal definidas (FLUEGGE et al., 2004). Sabe-se que o principal fator de virulência do GBS é o polissacarídeo capsular (do inglês, *capsular polysaccharide* – CPS), que participa da evasão da fagocitose pelo sistema imune do hospedeiro (LANCEFIELD, 1938). No entanto, vários fatores de adesão são expressos na superfície bacteriana, permitindo a ligação do microrganismo às proteínas da matriz extracelular de células epiteliais do colo e do trato genital (BORGES; SILVA; TEIXEIRA, 2012). Estes fatores também podem promover a invasão, seja por ruptura das camadas de células epiteliais ou por modulação do citoesqueleto (MAISEY; DORAN; NIZET, 2008; LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014). A figura 2 apresenta alguns desses fatores e a sua implicação nas etapas do processo de desenvolvimento da doença causada por GBS.

Virulence factor	Colonization	Adhesion	Invasion	Immune evasion	Neurotropism
Fibrinogen binding protein A (FbsA)	+	+			
Fibrinogen binding protein B (FbsB)			+		
Laminin binding protein (Lmb)			+		+
GBS surface adhesion (BsaB)	+	+	(+)		
Alpha C proteins (ACP)	+	+	+	+	
Serine rich repeat proteins (Srr)	+	+	+		
Pili	+	+	+	+	+
Hypervirulent GBS adhesiin (HvgA)	+	+	+	(+)	+
$\beta$ -hemolysin/cytolysin ( $\beta$ -H/C)	+	+	+	+	+
Capsular polysaccharides (CPS)				+	
Streptococcal C5a peptidase of GBS (ScpB)				+	
GBS immunogenic bacteria adhesion (BibA)				+	
Factor H				+	
IgA-binding beta-antigen				+	
D-alanylation				+	
Superoxide dismutase (SodA)				+	

**Figura 2.** Fatores de virulência de GBS e as suas funções na transição da colonização para doença invasiva.  
**Fonte:** LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014.

Um grupo de fatores de adesão do GBS é caracterizado pelo motivo altamente conservado LPxTG (Leu–Pro–X–Thr–Gly) na região C-terminal. Este motivo é clivado entre Thr e Gly pela enzima transpeptidase Sortase A, responsável pela ligação covalente do GBS à



parede celular do hospedeiro, promovendo a colonização e invasão. O primeiro grupo de fatores de adesão identificado contendo o motivo LPxTG foi a família das proteínas Alfa C, que promovem invasão de células epiteliais humanas por meio da ligação com a integrina  $\alpha 1\beta 1$  (BOLDUC; MADOFF, 2007). O segundo grupo de fatores de adesão contendo o motivo LPxTG é caracterizado pelas proteínas *serine-rich repeat* (Srr), que interagem com a queratina humana (SEO et al., 2013).

A investigação da contribuição do pilus na patogênese do GBS demonstrou a diminuição da aderência e invasão em linhagens celulares epiteliais e endoteliais por mutantes com ausência do pilus tipo 2a (KONTO-GHIORGHI et al., 2009). Estudos realizados em camundongos demonstraram que anticorpos específicos contra ilhas de pilus aumentaram a eliminação bacteriana mediada por opsonofagocitose, protegendo contra o quadro de sepse. Porém, o desenvolvimento de vacinas baseadas em estruturas de pili foi dificultado devido à sua expressão variável em diferentes cepas de GBS (NUCCITELLI et al., 2011).

Estudos realizados por Rioux e colaboradores (2001), demonstraram que a proteína Sip, ou proteína imunogênica de superfície (*surface immunogenic protein*), pode ser reconhecida na superfície celular de GBS por anticorpos específicos, havendo marcações na região septal e nos sítios polares de células de GBS. Este resultado confirmou que a proteína Sip está exposta na superfície bacteriana intacta, sugerindo que a sua distribuição seja restrita a certos sítios da célula. A proteína Sip caracteriza um alvo atrativo para o desenvolvimento de uma vacina sorotipo-independente devido à sua alta conservação dentre as diferentes cepas de GBS, resultado da sua presença no genoma central do microrganismo. A proteína Sip já foi detectada em cepas de GBS isoladas de peixes, gado e humanos, caracterizando um alvo vacinal relevante para diferentes espécies de hospedeiros (MARTIN et al., 2002; MAIONE, 2005; PEREIRA et al., 2013). Além disso, estudos demonstraram que a imunização de camundongos com a proteína Sip recombinante purificada foi capaz de induzir o desenvolvimento de uma resposta imune cruzada, protegendo contra infecção letal por cepas de GBS dos sorotipos Ia, Ib, II, III, V e VI (BRODEUR et al., 2000)

A evasão do sistema imune é outro ponto chave no processo de invasão. Uma das formas de evasão do sistema imune utilizada por GBS é a inativação proteolítica do componente C5a do complemento, mediada pela proteína ScpB (C5a peptidase de GBS) (BECKMANN et al., 2002; CHENG, 2002). Outros fatores inibitórios levam à redução da ligação dos fatores do sistema complemento. O fator H, por exemplo, controla a amplificação do C3, atuando como um regulador negativo da ativação do sistema complemento (MARUVADA; PRASADARAO; RUBENS, 2009).

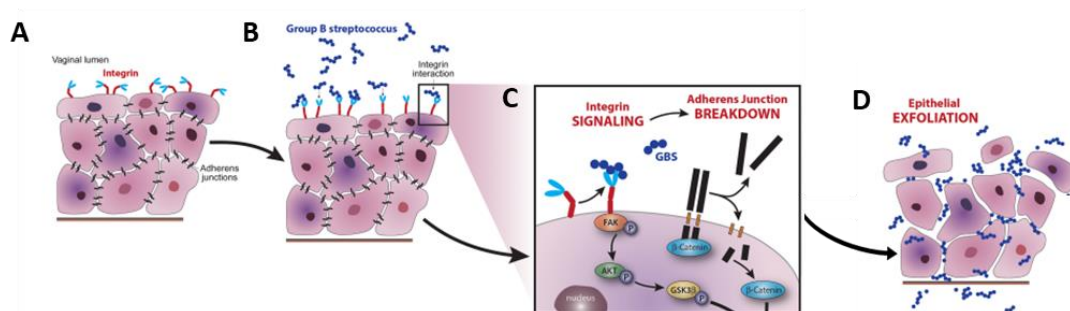
Outro fator inibitório do sistema complemento é a proteína BibA (adesina bacteriana imunogênica). Esta proteína parece estar envolvida tanto na evasão do sistema imune, através da ligação com a proteína C4bp (proteína ligadora de C4), um regulador da via clássica do sistema complemento, quanto no processo de adesão a células epiteliais humanas (SANTI et al., 2007). A transcrição de *bibA* pelo GBS é controlada pelo sistema regulatório CovS/CovR. A translocação de GBS do meio ácido da vagina (pH 5,5) para o pH neutro (pH 7,0) sinaliza a elevação da regulação dos fatores de virulência do GBS, levando à conversão de um fenótipo de colonização da trato geniturinário para o processo de infecção invasiva (SANTI et al., 2009b).

O GBS possui diferentes fatores de adesão e de virulência que permitem a colonização do nicho de mucosa genital e intestinal inferior. A colonização é propagada devido à capacidade intrínseca do GBS em manipular a imunidade celular local (LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014). O GBS normalmente reside como um organismo comensal, colonizando assintomaticamente o trato gastrointestinal e urogenital de aproximadamente 30% a 50% dos adultos saudáveis (VAN DER MEE-MARQUET et al., 2008; RAGUNATHAN; PONNURAJ, 2011; BAKER, 2013). No entanto, este microrganismo pode mudar o seu padrão para um patógeno invasivo, devido à capacidade de se infiltrar em diferentes nichos do hospedeiro, como o compartimento intrauterino, bem como vários órgãos do recém-nascido, como pulmão e cérebro (RAJAGOPAL, 2009).

Durante a gravidez, a vagina confere condições ideais para a multiplicação do GBS, o que pode ter consequências muito graves para a mãe e para o filho (BOYER et al., 1983). Os estreptococos do grupo B podem ser transmitidos ao recém-nascido via exposição a mucosa e aspiração durante o parto, ou devido à ascensão do organismo a partir da vagina para a placenta ou líquido amniótico (BAKER et al., 2017). Dessa forma, a colonização do trato genital materno caracteriza o fator de risco primário para a infecção de início precoce (DAUBY et al., 2016). A colonização por GBS pode causar bacteriúria assintomática ou infecções do trato urinário em mulheres gestantes. O GBS também causa morbidade materna significativa, resultando em infecções puerperais como amnionite, endometrite, bacteremia e sepse (PROENCA-MODENA et al., 2012). Infecções do trato urinário por GBS implicam resultados adversos durante a gravidez, como abortos, nascimentos prematuros, recém-nascidos de baixo peso, ruptura prematura de membranas, natimortalidade e corioamnionite (HIGH; EDWARDS; BAKER, 2005; RANABIR; DECHEN; SUMIT, 2010).

A colonização vaginal por GBS pode ser transiente ou intermitente, dependendo de alguns fatores, como o pH vaginal, microbiota normal, período gestacional e ciclo menstrual.

O GBS é capaz de aderir e invadir células epiteliais coriônicas e amnióticas. Determinantes do GBS que contribuem para a adesão celular e colonização incluem proteínas de superfície que facilitam a aderência a constituintes da matriz extracelular como colágeno, fibrinogênio, fibronectina e laminina (PATRAS et al., 2015). A aderência e a invasão dessas células são mediadas por vários fatores como IagA, uma glicosiltransferase envolvida no ancoramento do ácido lipoteicóico à superfície celular do hospedeiro, o pigmento hemolítico e o *quorum sensing* (VORNHAGEN; ADAMS WALDORF; RAJAGOPAL, 2017). Além disso, o GBS utiliza o processo de esfoliação epitelial para estabelecer uma infecção invasiva. Esse processo é estimulado a partir da ativação da integrina e  $\beta$ -catenina, levando à perda da função barreira e à transição epitelial para mesenquimal (EMT) nas células epiteliais vaginais, como descrito na figura 3 (VORNHAGEN et al., 2018).



**Figura 3.** Processo de exfoliação epitelial induzido pela interação do GBS e integrinas da célula hospedeira. **A.** Mucosa vaginal não colonizada. **B.** Colonização por GBS leva à ativação de integrinas **C.** Vias de sinalização resultam na translocação de  $\beta$ -catenina para o núcleo da célula, estimulando a expressão de genes envolvidos na quebra das junções aderentes intercelulares, conduzindo ao processo de exfoliação epitelial.

**Fonte:** Adaptado de Vornhagen e colaboradores (2018).

Os neutrófilos presentes no líquido amniótico podem fagocitar rapidamente diferentes espécies de *Streptococcus*, incluindo o *S. agalactiae*, que é comumente encontrado no líquido amniótico de mulheres com infecção (GOMEZ-LOPEZ et al., 2017). O processo de fagocitose do GBS é mediado pelos receptores tipo *toll 2* (do inglês, *toll like receptors - TLR*) e integrinas (LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014). No entanto, estes cocos também podem evadir da fagocitose de neutrófilos por diversos mecanismos. Um destes é a ligação à lectina 5 da imunoglobulina de ligação ao ácido siálico, uma proteína expressa na superfície de fagócitos. A capacidade do GBS em mimetizar os glicanos siálicos do hospedeiro permite que o patógeno ative inibidores de lectinas, atenuando a ativação de leucócitos (CARLIN et al., 2009). A partir do processo de evasão da fagocitose, o patógeno mantém-se apto a invadir e causar infecção no feto. Ainda são necessários mais estudos para compreensão das

condições que fazem o GBS perder a sua característica de colonização, adotando um perfil invasivo em relação às células do hospedeiro (LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014), bem como o desenvolvimento de medidas profiláticas para prevenção de infecções causada por GBS.

#### 1.4 PROFILAXIA INTRAPARTO

No início da década de 1980, ensaios clínicos demonstraram que a administração de antibióticos durante o trabalho de parto em mulheres com risco de transmissão de GBS para os recém-nascidos poderia prevenir doenças invasivas na primeira semana de vida (BOYER; GOTOFF, 1986; MOORE; SCHRAG; SCHUCHAT, 2003). No período de 1996 a 1997, uma colaboração entre o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), Colégio Americano de Obstetras e Ginecologistas (ACOG) e a Academia Americana de Pediatria, gerou a publicação de um guia para a prevenção de doença perinatal causada por *Streptococcus* do grupo B. Dentre outras observações, foi recomendada a implementação da profilaxia intraparto (do inglês, *intrapartum antibiotic prophylaxis – IAP*) com o intuito de prevenir a doença perinatal causada por GBS (SCHRAG et al., 2002).

Essas diretrizes indicam o uso de um dentre dois métodos de prevenção. A primeira abordagem está baseada no critério de risco, enquanto a segunda está relacionada com a seleção baseada em cultura bacteriana. O método baseado em risco identifica os candidatos para a quimioprofilaxia intraparto de acordo com a presença de um dos fatores de risco associados com a doença de início precoce, como parto com período de gestação inferior a 37 semanas, temperatura intraparto superior a 38°C ou ruptura das membranas por mais de 18 horas. O método baseado em seleção recomenda a triagem de todas as mulheres grávidas para a colonização vaginal e retal por GBS entre a 35ª e 37ª semanas de gestação. As mulheres colonizadas recebem antibióticos por via intravenosa no momento do trabalho de parto (SCHRAG et al., 2002).

Sob ambas as estratégias, as mulheres com bacteriúria por GBS durante a fase gestacional atual, ou que já deram à luz a um bebê com doença de início precoce causada por GBS, são candidatas à profilaxia antibiótica intraparto. As penicilinas e ampicilinas são as drogas de primeira escolha para combater infecções por GBS (VERANI; SCHRAG, 2010). A penicilina age com um espectro mais estreito de atividade antimicrobiana e com isto a taxa de seleção de organismos resistentes é menor. As drogas de segunda linha, representadas pelos

macrolídeos (eritromicina) e lincosamidas (clindamicina), são utilizados principalmente nos casos de gestantes alérgicas aos beta-lactâmicos (HAYS et al., 2016).

A implementação do *screening* universal de cultura de GBS pré-natal e a administração de profilaxia intraparto com antibiótico levaram a uma redução de 80% na incidência de GBS nos primeiros dias de vida neonatal, reduzindo significativamente as taxas de patologias causadas pelo microrganismo. Porém, um aumento significativo na resistência à eritromicina e clindamicina por GBS foi relatado em todo o mundo. A análise de diferentes cepas de GBS na Nova Zelândia revelou susceptibilidade à penicilina, mas resistência à clindamicina (15%) e eritromicina (7,5%), ambas associadas a cepas do sorotipo V (GRIMWOOD et al., 2002). Em um estudo realizado no Chile, incluindo 1.181 mulheres grávidas, 14,4% foram positivas para colonização por GBS. Destas, 13,7% foram resistentes à clindamicina e 9,5% foram resistentes à eritromicina (ABARZÚA et al., 2014). Além disso, um aumento no número de isolados com sensibilidade reduzida à penicilina foi encontrado no Japão (KIMURA et al., 2008). Nos Estados Unidos, foram identificados isolados com concentrações inibitórias mínimas (MIC) aumentadas para penicilina ou ampicilina (VERANI; SCHRAG, 2010; CAGNO; PETTIT; WEISS, 2012).

Apesar dos bons resultados obtidos a partir da adoção da profilaxia intraparto, estudos apontam que esta metodologia está associada com o aumento das taxas de infecção por bactérias gram-negativas, prematuridade e natimortalidade. Além disso, a LOD não se beneficiou destes protocolos de prevenção, de modo que as taxas de doença de início tardio, responsável pelo desenvolvimento de meningite, permanecem em 0,3 a 0,4 por 1000 nascidos vivos desde 1990 (JORDAN et al., 2008; CDC, 2013).

## 1.5 VACINAS CONTRA GBS

A vacinação atua diretamente na proteção individual e coletiva, prevenindo, controlando ou até mesmo erradicando a transmissão de doenças. Nesse contexto, a vacinação representa certamente a estratégia mais atraente para a prevenção de doenças causadas por GBS. Vacinas eficazes contra GBS devem ser capazes de estimular a produção de anticorpos funcionalmente ativos, e estes por sua vez, podem atravessar a placenta e fornecer proteção contra infecção neonatal (NUCCITELLI; RINAUDO; MAIONE, 2015).

Estudos realizados na década de 1970 mostraram uma correlação entre baixos níveis de anticorpos maternos contra o polissacarídeo do sorotipo III e uma maior susceptibilidade de neonatos à infecção por GBS. Portanto, o desenvolvimento de vacinas contra GBS esteve

focado principalmente no uso de antígenos capsulares (BAKER; MARCIA; RENCH, 1998). No entanto, a ativação de células T-independentes é uma limitação das vacinas compostas por antígenos polissacarídicos, principalmente por não induzirem células de memória. Além disso, a administração de dose reforço não resulta em potencialização da vacinação inicial (BAKER; MARCIA; RENCH, 1998).

Como as vacinas polissacarídicas não-conjugadas são pouco imunogênicas, buscou-se a potencialização das mesmas por meio do processo de conjugação com proteínas que promovam o estímulo do reconhecimento do antígeno de maneira T-dependente, potencializando a sua imunogenicidade. Além disso, a conjugação covalente entre a proteína em um polissacarídeo oferece potencial para indução de células B de memória contra o polissacarídeo (AVCI; KASPER, 2010). O primeiro teste de vacina conjugada contra GBS realizado em humanos envolveu a conjugação entre a cápsula do GBS do sorotipo III com toxóide tetânico (KASPER et al., 1996). Atualmente, uma vacina conjugada trivalente, composta de epítomos capsulares dos sorotipos Ia, Ib e III está na fase II de avaliação (NCT02046148). No entanto, a sua cobertura protetora dependerá da distribuição dos sorotipos de GBS na população alvo (BELARD et al., 2015).

Com o advento da vacinologia reversa, antígenos proteicos possivelmente imunogênicos passaram a ser identificados através de análises *in silico* a partir do genoma do microrganismo (PAOLETTI et al., 2001). O uso de antígenos proteicos presentes na superfície do GBS apresentou grande importância a partir da correlação entre baixos níveis de anticorpos contra antígenos de superfície e a detecção de uma maior susceptibilidade a graves infecções neonatais causadas por GBS (CHEN; AVCI; KASPER, 2014). Nesse contexto, as vacinas de subunidades caracterizam uma ferramenta importante para ser utilizada na indução de anticorpos com capacidade de se ligar ao patógeno, prevenindo a infecção. As vacinas de subunidades podem ser desenvolvidas a partir de um ou mais antígenos particulares capazes de estimular o sistema imune (BAXTER, 2007).

Muitos fatores de virulência de GBS já foram avaliados como candidatos vacinais. Alguns destes foram testados em animais, tais como a proteína C5α peptidase, α-C e β-C, Rib, LmbP (*laminin-binding protein*), Sip (*Surface immunogenic protein*), LrrG (*Leucine-rich repeat protein*), BibA (*group B Streptococcus immunogenic bacterial adhesin*) e proteínas estruturais do pílus (LARSSON et al., 2004; JOHRI et al., 2006). Na figura abaixo é possível ter conhecimento das vacinas que estão atualmente nas fases de testes.

Developer	Candidate name/identifier	Preclinical	Phase I	Phase II	POC	Phase III
NIH	Tetanus toxoid-CPS conjugates: monovalent (multiple studies), bivalent (one study); CRM197-CPS conjugate: monovalent (one study)	x	x	x	x (trial in pregnant women)	
Novartis/GSK	CRM197-CPS conjugates: monovalent (multiple), trivalent (several)	x	x	x	x (trial in pregnant women)	
Minervax	N-terminal domains of the Rib and AlphaC surface proteins	x	x			
Novartis/GSK	Pilus proteins	x				
Various academic groups	Other protein(s) and/or protein-CPS conjugates	x				

**Figura 4.** Status do desenvolvimento dos candidatos vacinais atuais para *S. agalactiae*.  
**Fonte:** HEATH, 2016.

Existem muitas proteínas imunogênicas na superfície do GBS que poderiam agir como antígenos protetores por si próprias (PAOLETTI; KASPER, 2002). Muitas dessas proteínas são caracterizadas como fatores de virulência, cujo uso no desenvolvimento de formulações vacinais contra o GBS poderia favorecer a inibição de infecções causadas pelo patógeno. Somando-se a isso, o uso de proteínas como antígenos vacinais caracteriza uma alternativa de menor custo e maior cobertura quando comparada às vacinas conjugadas, perfazendo uma metodologia alternativa para prevenção de doenças causadas pelo GBS (JOHRI et al., 2006).

### 1.5.1 Licenciamento de formulações vacinais para GBS

Atualmente, o desafio na realização de ensaios clínicos de eficácia em humanos é um dos fatores que compromete o licenciamento de vacinas contra GBS, especialmente devido à baixa incidência de doenças neonatais (NUCCITELLI; RINAUDO; MAIONE, 2015). Uma dificuldade no licenciamento de uma vacina contra GBS está relacionada à necessidade de imunização de gestantes, incorrendo na possibilidade do desenvolvimento de efeitos adversos nos fetos. Existem vários guias que estabelecem orientações voltadas ao licenciamento de vacinas desenvolvidas para gestantes (ROBERTS; GRUBER, 2015). Preconiza-se que a administração de uma formulação vacinal contra GBS em gestantes ocorra no início do terceiro trimestre de gravidez, visando eliminar o risco de não se incluir aproximadamente 30% dos casos de GBS que ocasionam o parto prematuro (NUCCITELLI; RINAUDO; MAIONE, 2015). Uma alternativa à essa problemática é a possibilidade de imunização de adolescentes não gestantes com formulações vacinais capazes de gerar reposta imunológica protetora de memória (MADHI et al., 2003).

Outra consideração importante para o desenvolvimento de uma formulação vacinal contra GBS é determinar se a licença exigirá ensaios clínicos randomizados em larga escala, que demonstrem eficácia contra a doença clínica, ou se a aprovação regulatória pode ser

baseada na demonstração da obtenção de correlatos sorológicos de proteção (HEATH, 2016). Um correlato sorológico de proteção é definido como uma resposta imune responsável pela proteção e também estatisticamente interrelacionado com a proteção. A determinação de um correlato de proteção fornece um critério objetivo para a avaliação da resposta imunológica de indivíduos vacinados, permitindo o licenciamento de uma vacina sem demonstração de eficácia de campo em situações em que os ensaios clínicos são perigosos ou quando são testadas novas combinações de vacinas existentes (PLOTKIN, 2010).

Estudos anteriores realizados com vacinas contra GBS demonstraram que altos níveis de anticorpos maternos CPS-específicos no momento do parto estavam correlacionados a um alto nível de proteção contra a doença de início precoce (BAKER et al., 2014). Esses dados apoiam uma nova estratégia que poderia ser empregada no auxílio do registro de uma vacina contra o GBS, baseando-se na quantificação e na avaliação da funcionalidade de anticorpos específicos induzidos pelas formulações vacinas, adotando-se um correlato de proteção ao invés do uso de ensaios clínicos mais complexos (BLACK et al., 2000; NUCCITELLI; RINAUDO; MAIONE, 2015).

Para a avaliação da vacina contra pneumococo, dois métodos imunológicos padrão foram utilizados, sendo estes o ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) e o ensaio de morte por opsonofagocitose (OPKA), respectivamente capazes de medir a quantidade e a qualidade dos anticorpos CPS-específicos. Ambos os métodos estão bem estabelecidos e são aceitos como ensaios padrão para a avaliação da eficácia da vacina contra pneumococo (ROMERO-STEINER et al., 2006). Nesse contexto, as autoridades reguladoras poderiam levar em consideração a morte do GBS por opsonofagocitose, induzida por soros de indivíduos imunizados, como um correlato sorológico de eficácia, determinando a presença de anticorpos funcionais por meio de ensaios *in vitro* (SONG et al., 2018).

A capacidade de uma amostra de soro para opsonizar bactérias pode ser medida por vários ensaios de opsonofagocitose *in vitro*, que demonstram ser o melhor correlato funcional de proteção em vários estudos (ROMERO-STEINER et al., 2006). Ensaios de OPKA configuram os métodos mais comumente utilizados para avaliar anticorpos funcionais contra GBS em soros pós-imunização, imitando o processo de morte *in vivo* por células efectoras do hospedeiro, após opsonização por anticorpos específicos (GUTTORMSEN; LIU; PAOLETTI, 2008). Dessa forma, o uso de testes eficazes para avaliação da resposta de anticorpos torna-se uma solução possível para superar as dificuldades na condução de testes clínicos, favorecendo o licenciamento de formulações vacinais contra GBS.



### **1.5.2 Vias de imunização e adjuvantes**

As superfícies mucosas recobrem uma enorme área do corpo (300-400 m<sup>2</sup>), incluindo os tratos gastrointestinal, urogenital e respiratório (MCGHEE; FUJIHASHI, 2012). Os maiores sítios imunes indutores são o tecido linfoide associado ao intestino (GALT) e o tecido linfoide associado à nasofaringe (NALT). O NALT inclui as tonsilas/adenoides, o tecido linfoide associado aos brônquios e os linfonodos cervicais e hilares (BRANDTZAEG et al., 2008). Assim, a vacinação por vias mucosas pode levar à indução de respostas humorais e celulares antígeno-específicas nos compartimentos sistêmico e também de mucosa (LYCKE, 2012).

Avanços recentes em vacinologia contribuíram para a identificação de novos candidatos vacinais, sistemas de entrega de antígenos e adjuvantes que podem ser administrados por superfícies mucosas. Estas vacinas podem ser entregues através de diferentes superfícies mucosas (retal, vaginal, vias conjuntivais, orais ou nasais), mas é importante salientar que nem todas estas opções são factíveis (WALLIS; SHENTON; CARLISLE, 2019). O uso da via retal implica na inoculação do antígeno em meio a várias culturas bacterianas; a mucosa vaginal, que embora tenha sítios de indução, é uma opção apenas para mulheres; nas conjuntivais, a instilação de antígenos pode provocar o processo de inflamação conjuntival. Nesse contexto, imunizações por via oral e nasal são as opções mais adequadas para o uso de vias de mucosa para imunização (LEVINE; DOUGAN, 1998).

Vacinas administradas por superfícies mucosas também são capazes de induzir anticorpos séricos do tipo IgG, com capacidade de neutralizar, inibir a adesão bacteriana e induzir respostas imunológicas sistêmicas mediadas por células, incluindo linfócitos T CD8 citotóxicos (LEVINE; DOUGAN, 1998). As vacinas administradas por via intranasal levam à indução de imunoglobulina A secretada (sIgA) nos tratos respiratórios superior e inferior e também no trato genital, contribuindo para respostas locais mais fortes contra patógenos de mucosa, como é o caso do GBS (MEEUSEN, 2011; PEDERSEN; COX, 2012).

Apesar de ser uma via de imunização amplamente utilizada, alguns fatores importantes devem ser considerados em relação ao uso desta rota de administração vacinal. Os componentes das formulações vacinais administrados por vias mucosas precisam ser resistentes à degradação causada pelo ambiente mucoso, caracterizado pela presença de proteases, nucleases e baixo pH. Para isso, as vacinas de mucosa devem ser cuidadosamente formuladas com o intuito de proteger os componentes vacinais. Alguns veículos de entrega podem ser administrados de modo a favorecer a estabilidade dos antígenos contidos em

formulações vacinais. Esporos de *Bacillus subtilis*, expressando antígenos heterólogos na sua superfície, caracterizam um veículo adjuvante de mucosa que tem sido considerado para administração de antígenos proteicos (DE SOUZA et al., 2014). Essa tecnologia se vale de uma abordagem não recombinante para apresentar proteínas heterólogas na superfície de esporos através de um processo de adsorção. Por sua vez, os antígenos adsorvidos aos esporos são capazes de induzir respostas imunes específicas e protetoras em imunização por via de mucosa (HUANG et al., 2010).

Além disso, novos sistemas de entrega de antígenos foram desenvolvidos para a administração de antígenos vacinais a superfícies mucosas, visando a indução de respostas efetoras mais robustas. Abordagens promissoras incluem o uso de nanopartículas, lipossomas, partículas semelhantes a vírus e virossomas (GILL, 2013). O sistema de entrega baseado em nanocarreadores pode proteger as vacinas da degradação prematura, melhorar a estabilidade, tem boas propriedades adjuvantes e também auxilia na entrega direcionada de um antígeno às células apresentadoras de antígenos (APCs) (DURÁN et al., 2019). Entre vários polímeros, o ácido  $\gamma$ -poliglutâmico ( $\gamma$ -PGA), ácido polilático (PLA), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poli (hidroxibutirato) (PHB), poli (ácido glicólico) (PGA), poli (e-caprolactona) (PCL) são os polímeros que foram principalmente investigados para a fabricação de nanopartículas (SAHDEV; OCHYL; MOON, 2014; RAHIMIAN et al., 2015). As partículas preparadas a partir desses polímeros são biodegradáveis e biocompatíveis, altamente capazes de interagir com DNA, peptídeos e proteínas (NANDEDKAR, 2009).

Sistemas de entrega mais eficientes podem contribuir para o desenvolvimento de respostas imunológicas duradouras, com efeitos colaterais diminuídos e o uso de um menor número de doses (PATI; SHEVTSOV; SONAWANE, 2018). No entanto, além da proteção do antígeno, é preciso levar em consideração a imunogenicidade do antígeno administrado por via de mucosa, muitas vezes requerendo a coadministração de adjuvantes, a fim de romper as barreiras da mucosa do hospedeiro e permitir que os antígenos atinjam e estimulem as células alvo (WOODROW; BENNETT; LO, 2012). Por esse motivo, vários adjuvantes podem ser testados com o intuito de aumentar a resposta imune da mucosa contra os antígenos contidos na formação vacinal.

A enterotoxina termo lábil de *E. coli* (LT) é reconhecida como um dos imunomoduladores mais efetivos, caracterizando o adjuvante de mucosa mais potente (DA HORA et al., 2011). Porém, o seu uso em humanos não é possível devido a sua alta toxicidade. Para superar essa questão, modificações foram feitas para obtenção de versões atóxicas ou atenuadas de LT. A LTK63R é um mutante de LT na subunidade A (mutação

serina 63 para lisina), resultando na perda completa da atividade enzimática (PIZZA et al., 1994). De maneira semelhante à LT, a LTK63R é altamente imunogênica e capaz de potencializar a resposta imunológica contra antígenos proteicos (DE MAGISTRIS et al., 1998).

Outra opção de adjuvante é o  $\alpha$ -GalCer (KRN7000), um ativador de células *natural killer* T invariantes (iNKT), células que normalmente reconhecem antígenos glicolipídicos (BORG et al., 2007). A ativação de células NKT por  $\alpha$ -GalCer demonstrou ter um forte efeito como adjuvante vacinal em repostas contra infecções virais e frente a tumores (KO et al., 2005). Estudos recentes demonstraram que respostas imunes da mucosa foram potencializadas em uma vacina oral contra o ETEC usando  $\alpha$ -GalCer como adjuvante (DAVITT et al., 2016), abrindo as possibilidades de uso deste adjuvante em formulações vacinais também contra agentes bacterianos.

A utilização de uma abordagem vacinal de mucosa associada a sistemas de entrega eficientes poderia auxiliar na promoção de indução de respostas imunes capazes de proteger indivíduos contra a infecção invasiva causada pelo GBS. Além dos sistemas de entrega de antígenos, a coadministração de adjuvantes pode levar à potencialização da resposta antígeno-específica, favorecendo a indução de respostas imunológicas duradouras e de memória frente ao patógeno.

### **1.5.3. Imunidade ativa e passiva**

O desenvolvimento da imunidade adaptativa pode ser alcançado através da imunização ativa ou passiva. A imunidade ativa refere-se ao processo de exposição do organismo a uma substância exógena/antígeno, seja de forma natural ou por meio da administração de formulações vacinais, estimulando o sistema imune a montar uma resposta voltada à eliminação de determinado patógeno (MARSHALL et al., 2018). Esta resposta leva dias/semanas para ser desenvolvida, mas pode ser duradoura e de memória, podendo apresentar atividade por toda a vida (BAXTER, 2007). Um dos ramos do sistema imunológico adquirido é mediado pela indução de células secretoras de anticorpos. Anticorpos são ferramentas eficazes utilizadas na prevenção e tratamento de várias doenças infecciosas. No caso de doenças bacterianas, anticorpos são capazes de neutralizar toxinas e facilitar a opsonização e a lise bacteriana (KELLER; STIEHM, 2000).

Por sua vez, a imunidade passiva é geralmente classificada como natural ou adquirida/artificial. A imunidade passiva pode ocorrer naturalmente por meio da transferência

transplacentária de anticorpos maternos para o feto em desenvolvimento, como é o caso da transferência de anticorpos maternos contra o toxóide tetânico e pertussis (MUNOZ et al., 2014; MARSHALL et al., 2018). A imunidade passiva natural permite que o recém-nascido tenha anticorpos maternos circulantes durante várias semanas/meses até que este seja degradado. Por outro lado, a imunidade passiva artificial é caracterizada pela transferência de soro de indivíduos imunes ou anticorpos monoclonais exógenos para serem injetados e protegerem um paciente suscetível. A imunidade passiva fornece proteção imediata, mas de curta duração, sendo frequentemente usada em crianças e adultos, que possuam um sistema imunológico debilitado ou que não se caracterizem como bons candidatos à vacinação de rotina (BAXTER, 2007).

A transferência transplacentária de IgG durante a gestação é capaz de fornecer imunidade passiva ao recém-nascido e é crucial para a proteção contra infecções no início da vida. A vacinação na gravidez funciona aumentando a concentração de anticorpos específicos da mãe, aumentando consequentemente a quantidade de anticorpos transportada para o feto através da placenta (WILCOX; HOLDER; JONES, 2017). Isso pode fornecer proteção eficaz ao recém-nascido até que o período de maior vulnerabilidade tenha passado ou até o momento das vacinas de rotina para bebês. Portanto, como destacado anteriormente, a imunização materna torna-se uma das estratégias mais eficazes para proteger o recém-nascido da infecção por GBS, conferindo imunidade passiva contra o patógeno.

## 1.6 JUSTIFICATIVA PARA O DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ABORDAGEM VACINAL

As estratégias atualmente empregadas na prevenção de infecções por GBS requerem o uso de antibióticos, favorecendo o surgimento de cepas resistentes durante o período perinatal (GLEZEN; ALPERS, 1999). A adoção de IAP não evita a ocorrência de infecções de início tardio e a ocorrência de infecção ascendente pelo GBS, que é responsável pela prematuridade e por nascimentos mortos (SCHUCHAT, 1998; BOLDENOW et al., 2016). Nesse contexto, o desenvolvimento de estratégias vacinais voltadas para gestantes poderia ser uma ferramenta na prevenção de infecções causadas por GBS, protegendo mães e crianças (MADHI et al., 2013). Diversos grupos propuseram a utilização de antígenos proteicos como vacina contra infecção por GBS como uma alternativa de menor custo e maior cobertura à vacina conjugada (JOHRI et al., 2006), de modo que uma vacina materna contra o GBS pode ser uma intervenção econômica factível em países de baixa renda, especialmente em áreas com altas

taxas de mortalidade (KIM et al., 2017; RUSSELL et al., 2017a). na busca de uma única proteína protetora, presente em todos os sorotipos, as proteínas Sip e BibA caracterizam antígenos promissores para avaliação da indução de proteção contra colonização e infecções por GBS (MARTIN et al., 2002; SANTI et al., 2009b). Tomados em conjunto, todos esses dados corroboram para a necessidade de desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra o GBS, suportando o uso de antígenos proteicos conservados como parte de uma formulação vacinal efetiva.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma formulação vacinal recombinante contra *Streptococcus agalactiae* baseada na utilização dos antígenos proteicos de superfície Sip e BibA.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar, amplificar e subclonar os genes alvos em vetores para expressão em cepas de *B. subtilis* e *E. coli*;
- b) Expressar, purificar e caracterizar os antígenos vacinais;
- c) Avaliar a capacidade de indução de repostas imunológicas contra os antígenos por meio da produção de soro policlonal;
- d) Imunizar camundongos por via subcutânea e via intranasal, comparando a ação de diferentes adjuvantes;
- e) Avaliar as respostas imunes humoral e celular;
- f) Avaliar a funcionalidade dos anticorpos gerados por meio de ensaios de opsonofagocitose, inibição da formação de biofilme e invasão de células epiteliais;
- g) Padronizar os desafios letal e de colonização com *S. agalactiae*;
- h) Desafiar os animais imunizados com *S. agalactiae* para avaliar a proteção conferida pelas diferentes formulações vacinais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CLONAGEM DOS GENES *sip* e *bibA* de *S. agalactiae*

Foram escolhidas inicialmente as proteínas de superfície Sip (*surface immunogenic protein*) e BibA (adesina bacteriana imunogênica) de GBS para avaliação quanto aos seus usos como antígenos vacinais. Ambas as sequências genéticas foram obtidas a partir do genoma de *S. agalactiae* do sorotipo V (2603 V/R - ATCC BAA-611) (GenBank: FJ801024.1). Um gene sintético contendo a sequência codificadora para a proteína Sip, previamente disponível no laboratório, continha sítios de restrição compatíveis para subclonagem em vetores para expressão em *Bacillus subtilis* (pHT08 e pHCMC03). Em adição, também foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para amplificação da sequência nucleotídica do gene *sip* para realizar a sua clonagem no plasmídeo pET28a, permitindo a sua expressão em cepas de *E. coli* BL21(DE3).

Também foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene *bibA* completo (sem a região transmembrana e peptídeo sinal, a partir do aminoácido 34 até o aminoácido 622), e para amplificação do seu domínio rico em  $\alpha$ -hélice (a partir do aminoácido 34 até o aminoácido 394). Todas as sequências dos iniciadores direto e reverso foram desenhadas contendo os sítios de restrição para as enzimas *NdeI* na porção 5' e *XhoI* na porção 3'. Os iniciadores foram desenhados para subclonagem dos genes no vetor de expressão pET28a, visando a manutenção da cauda de histidina apenas na porção N-terminal das sequências proteicas, e estão descritos na tabela 1.

Iniciadores	Sequência (5' -> 3')	Sítio de Restrição
Sip-Direto	GCGCATATGCAAGAAACAGATACAACATG	<i>NdeI</i>
Sip-Reverso	CGCCTCGAGTTATTTGTTGAAAGAAACATGAACAT	<i>XhoI</i>
BibA-Direto	CGCCATATGCACGCGGATACTAGTTCAGGA	<i>NdeI</i>
BibA-Reverso	CGCCTCGAGTTAAATTGCTAAGAGTGGACTTGC	<i>XhoI</i>
BibA-Dom-Reverso	CGCCTCGAGTTAACCTCTGGTAAGGTCTTGAA	<i>XhoI</i>

**Tabela 1.** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes *sip* e *bibA* a partir de sequências molde do sorotipo V de *S. agalactiae*.

Os oligonucleotídeos recebidos foram centrifugados por 1 minuto a 5.000 rpm e diluídos em H<sub>2</sub>O ultrapura a uma concentração final de 100 pmol/ $\mu$ L. Em seguida, os tubos contendo os oligos foram homogeneizados e incubados por 18 horas a 4°C para completa

diluição. Para amplificação do gene *sip*, utilizou-se como molde o gene sintético (DNA plasmideal). Para amplificação do gene *bibA*, utilizou-se como molde o DNA genômico obtido a partir da fervura de 5 colônias em 10 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura. Todos os fragmentos foram amplificados com a enzima DNA polimerase de alta fidelidade *High Fidelity DNA Polymerase* (Fermentas). As concentrações dos reagentes utilizados para amplificação de todos os fragmentos estão descritas na tabela 2.

Componentes	Volume	Concentração inicial	Concentração final
Tampão PCR	2,5 µL	10X	1 X
MgCl <sub>2</sub>	0,5 µL	50 mM	1 mM
dNTP	2 µL	10 mM/µL	1,25 mM
Iniciador direto	1 µL	10 pmol/µL	0,5 pmol
Iniciador reverso	1 µL	10 pmol/µL	0,5 pmol
High Fidelity DNA Polimerase	0,4 µL	2,5 U/ µL	1 U
DNA molde	1 µL	100 ng	Variável
Água ultra-pura	16,6 µL	-	-
Total	25 µL	-	-

**Tabela 2.** Reagentes e respectivas concentrações para preparo das reações de amplificação dos fragmentos de DNA por PCR.

As amostras amplificadas de acordo com a temperatura de anelamento indicada para cada um dos pares de oligonucleotídeos iniciadores foram purificadas a partir de gel de agarose a 1% através do uso do kit de purificação de *DNA Illustra Gfx* (GE Healthcare). Os DNAs purificados foram eluídos em H<sub>2</sub>O ultrapura, quantificados e então (i) submetidos a ligação com o vetor *pGEM-T Easy* (Promega) ou (ii) submetidos a digestão com as enzimas *NdeI* e *XhoI* para ligação com o plasmídeo pET28a.

As digestões dos produtos de PCR foram conduzidas por 4 horas a 37°C com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, em tampão O (ThermoScientific), em um volume de 30 µL. Os produtos digeridos foram purificados a partir de gel de agarose a 1% e em seguida, submetidos a ligação. Utilizou-se uma proporção de 3:1 de DNA plasmideal para cada inserto. As ligações foram conduzidas por 16 horas, a 4°C e armazenadas a -20°C para posterior transformação em células quimiocompetentes.

### 3.1.2 Recuperação do gene sintético *bibA*

O clone sintético contendo a sequência codificadora do gene *bibA* do sorotipo V de *S. agalactiae* foi obtido pela empresa GenScript e recebido nos vetores pUC57 e pET28a. Os plasmídeos foram recebidos na forma liofilizada. Após centrifugação a 5000 rpm por 1 minuto, adicionou-se a cada tubo 40 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura para eluição dos plasmídeos,



resultando em uma concentração final de 100 ng/ $\mu$ L. Os plasmídeos eluídos foram armazenados a -20 °C para posterior transformação em células quimiocompetentes.

### **3.1.3 Transformação e seleção dos clones positivos**

As ligações realizadas com os plasmídeos pGEMT e pET28a foram transformadas em células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes, por meio de choque térmico (incubação a 42 °C por 2 minutos, seguida de incubação em gelo por 5 minutos). Após recuperação das células por incubação em meio LB (*Lysogeny broth*), por 1 hora, 37°C, 200 rpm, a cultura foi centrifugada, sendo os *pellets* plaqueados em LB mais 100  $\mu$ g/mL de ampicilina (para pGEM-T) e LB mais 50  $\mu$ g/mL de canamicina (para pET28a). As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C.

Foram selecionadas colônias referentes a cada clonagem para lançamento de inóculos. Cada colônia isolada foi utilizada para preparo de um inóculo em 5 mL de meio LB contendo o respectivo antibiótico. Os inóculos foram incubados sob agitação de 200 rpm, por 18 horas a 37°C. As células foram coletadas por centrifugação e submetidas à extração do DNA plasmideal, seguida de digestão com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. Os clones positivos, determinados pela liberação dos genes de interesse, foram analisados por sequenciamento para confirmação das sequências nucleotídicas (verificação da ausência de mutações).

## **3.2 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA Sip EM *Bacillus subtilis***

O primeiro passo para realização da expressão da proteína Sip em *B. subtilis* foi a obtenção de células competentes para transformação dos plasmídeos contendo o gene de interesse. Com esse objetivo, foram preparadas células competentes de *Bacillus subtilis* 1012 (tipo selvagem) e *Bacillus subtilis* InvA (invasina de *Yersinia pseudotuberculosis*).

### **3.2.1 Preparo de *Bacillus subtilis* competentes**

Células competentes de *Bacillus subtilis* 1012 e *Bacillus subtilis* InvA (invasina de *Yersinia pseudotuberculosis*), foram preparadas utilizando o meio S-base (*Spizizen's salt*: 2 g de sulfato de amônio, 14 g de fosfato dipotássico, 6 g de fosfato monopotássico, 1 g citrato de sódio, em 100 mL com água destilada, adicionado de 0,1 mL de sulfato de magnésio 1M após autoclavagem) e os métodos descritos pelo manual da MoBiTec (2013). Cada cepa foi inoculada em 5 mL de meio HS (tabela 3) para crescimento por 18 horas, a 37°C, 200 rpm. Utilizou-se 0,5 mL dessa cultura para inoculação de 50 mL de meio HS, seguido de incubação

a 37°C, 200 rpm, até as células atingirem a  $DO_{600nm}$  de 1. Nessa etapa, a cultura foi adicionada de glicerol, a uma concentração o final de 30%, e alíquotas de 1 mL foram estocadas a -80°C.

Meio HS* (100 mL)		Meio LS* (100 mL)	
H <sub>2</sub> O destilada	66,5 mL	H <sub>2</sub> O destilada	80 mL
10x S-base	10 mL	10x S-base	10 mL
Glicose 20% (p/v)	2,5 mL	Glicose 20% (p/v)	2,5 mL
L-triptofano 0,1 %**	5 mL	L-triptofano 0,1 %**	0,5 mL
Caseína 2%	1 mL	Caseína 2%	0,5 mL
Extrato de levedura 10 %	5 mL	Extrato de levedura 2%	5 mL
Arginina 8%, Histidina 0,4%	10 mL	1 mM MgCl <sub>2</sub>	0,25 mL
-	-	1 mM CaCl <sub>2</sub>	0.05 mL

\* Autoclavar os componentes separadamente; \*\* L-triptofano: esterilizar por filtração.

**Tabela 3.** Meios de cultura HS e LS para preparo de *Bacillus subtilis* quimiocompetentes

Fonte: MoBiTec, 2013.

Para transformação, uma alíquota de cada cepa foi descongelada e inoculada em 20 mL de meio LS (tabela 3). As culturas foram incubadas sob agitação de 100 rpm, a 30°C. Após 2 horas de incubação, adicionou-se 10 µL EGTA 0,1 M a 1 mL de cultura, seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, adicionou-se à cada tubo o respectivo DNA plasmideal (pHT08-Vazio, pHT08-Sip, pHCMC03-Vazio, pHCMC03-Sip). As amostras foram então incubadas por 2 horas, a 37°C, 200 rpm. Após esse período, as células foram recuperadas por centrifugação e plaqueadas em meio LB adicionado de 30 µg/mL de cloranfenicol para pHT08, ou cloranfenicol e espectinomicina para pHCMC03, e incubadas em estufa a 37°C, por 18 horas.

### 3.2.2 Teste de expressão em *Bacillus subtilis*

Utilizou-se 5 mL de uma pré-cultura crescida por 18 horas, a 37°C, 200 rpm, para inoculação de 50 mL de meio LB. O inoculo foi incubado a 37°C, 200 rpm até atingir uma densidade óptica a 600 nanômetros ( $DO_{600nm}$ ) de 1. Nesse ponto, as culturas foram induzidas com 1 mM de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside), por 4 horas. Após indução, as células foram recuperadas por centrifugação para posterior lise.

As células foram ressuspensas em 2,5 mL de tampão A (0,1 M de Tris-HCl, 0,5 M de NaCl, pH 7,5), adicionadas de 50 µg/mL de lisozima e incubadas em gelo por 1 hora. Após esse período, adicionou-se ao lisado 1 mM de PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*), que foi

então submetido a sonicação (6 pulsos de 30 segundos, com intervalos de 1 minuto a uma amplitude de 35%). Após lise, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 rpm, sendo a fração solúvel coletada para análise.

### 3.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *Escherichia coli*

Os genes codificadores para as proteínas Sip e BibA, previamente clonados em vetor de expressão pET28a, foram transformadas em diferentes linhagens de *E. coli*. O plasmídeo obtido após ligação do gene *sip* em pET28a (pET28a-Sip) foi transformado nas linhagens de *E. coli* BL21(DE3), Actic Express e Lemo BL21(DE3). O plasmídeo pET28a-BibA foi transformado em *Escherichia coli* BL21(DE3) e pLysS cic.

#### 3.3.1 Teste de expressão das proteínas recombinantes

Inicialmente, após transformação em *E. coli* BL21(DE3) e pLysS cic, 3 a 4 clones de cada proteína foram selecionados para realização de testes de expressão. Cada colônia foi inoculada em 5 mL de meio LB adicionado de 50 µg/mL de canamicina. Os inóculos foram incubados a 37°C, 200 rpm por 16 horas. Realizou-se a inoculação de 50 mL de meio TB (*Terrific Broth*) ou LB com 500 µL de cada pré-inóculo. A densidade ótica das culturas foi acompanhada até que as mesmas atingissem um DO<sub>600nm</sub> entre 0,6 e 0,8. Nesse ponto, coletou-se uma alíquota de cada cultura (T0) sendo o restante das células induzidas com 0,5 mM de IPTG para expressão da proteína recombinante. As culturas foram induzidas por 4 horas, a 37°C, 200 rpm. Após a 4 horas de indução, coletou-se uma nova alíquota da indução (T4), sendo o restante das culturas centrifugado a 10.000 rpm, por 10 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets armazenados a -20°C.

As alíquotas referentes aos tempos T0 e T4 foram coletadas, centrifugadas e adicionadas de 50 µL de tampão de amostra 4X (40 mM Tris-HCl 1M pH 6,8, 1% dodecil sulfato de sódio, 2,5% β-mercaptoetanol, 6% glicerol, 0,005% azul de bromofenol), seguido de aquecimento a 95°C por 5 minutos, para avaliação por meio das técnicas de SDS-PAGE e imunodeteccção.

#### 3.3.2 Avaliação da solubilidade da proteína expressa

Para determinação da solubilidade das proteínas expressas, os *pellets* das culturas induzidas foram descongelados e ressuspensos em 10 mL de tampão A (50 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl, 20 mM de imidazol, 5% glicerol). As amostras foram incubadas em

gelo por 40 minutos com 200 µg/mL de lisozima, adicionadas de 1 mM de PMSF. Após esse período, as células foram sonicadas por 7 pulsos de 30 segundos a uma amplitude de 35%, com intervalos de 59 segundos. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos, para separação da fração solúvel (sobrenadante) da fração insolúvel (*pellet*) de cada amostra.

As frações insolúveis foram ressuspensas em 500 µL de tampão ureia (8M de ureia, 500 mM de NaCl, 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), homogeneizadas e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos. As amostras solúveis (10 µL da amostra mais 3,5 µL de tampão de amostra) e insolúveis (0,5 µL da amostra, 9,5 µL de tampão ureia e 3,5 µL de tampão de amostra) foram analisadas através de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12,5% para a proteína Sip, e a 10% para a proteína BibA.

### 3.3.3 Escalonamento da expressão das proteínas recombinantes

Com o intuito de obter maiores quantidades da proteína recombinante, mas mantendo a sua expressão na fração solúvel, algumas tentativas foram realizadas. Para isso, a proteína Sip foi expressa na cepa de *E. coli* BL21(DE3) em diferentes condições de cultivo (tabela 4). Após indução, todas as amostras foram processadas como descrito no item anterior, de modo a se obter o comparativo entre as diferentes condições utilizadas, visando a otimização da obtenção do antígeno vacinal.

Variáveis	Condições utilizadas					
	200 mL		500 mL		500 mL	
Meio de cultura	LB	TB	LB	TB	LB	TB
Temperatura	37°C	37°C	37°C	37°C	18°C	18°C
Tempo	4 horas	4 horas	2 horas	2 horas	18 horas	18 horas
IPTG	0,5 mM	0,5 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM	0,25 mM

**Tabela 4.** Diferentes condições de indução da expressão da proteína Sip.

Além disso, a expressão da proteína Sip também foi avaliada em duas outras cepas - *E. coli* Lemo21(DE3) e Arctic Express (DE3). A cepa Arctic expressa chaperoninas, e sua expressão é favorecida a baixas temperaturas, portanto, a proteína Sip foi induzida assim que a cultura atingiu uma DO<sub>600nm</sub> de 2, com 0,5 mM de IPTG, por 18 horas, a 18°C, 200 rpm. A expressão em Lemo21 foi realizada em duas condições, 4 horas, 37°C, 200 rpm, ou 18 horas,

a 30°C, 200 rpm. Em ambos os casos foi feita a adição de 0 a 2000 mM de L-raminose na cultura no momento da indução com 0,5 mM de IPTG.

A proteína BibA só foi testada quanto ao aumento de escala de produção, sendo as condições de 100 e 200 mL de volume de cultura induzidos nas mesmas condições descritas para a expressão em 50 mL de cultura.

### **3.3.4 Purificação de corpos de inclusão e reenovelamento (*refolding*)**

Para purificação da proteína Sip a partir da fração insolúvel (corpos de inclusão), foram utilizadas as etapas de solubilização/desnaturação e renaturação dos corpos de inclusão utilizando ureia 8 M, em tampão A. Para cada 200 mL de indução, adicionou-se ao *pellet* insolúvel 6 mL de tampão ureia. A amostra foi incubada sob agitação, a 4°C até solubilização da maior parte do *pellet*. Após essa etapa, o extrato solubilizado foi submetido a reenovelamento por meio do método de diluição pulsada. Nessa etapa, 6 mL de extrato foram adicionados lentamente a 500 mL de tampão A, por gotejamento. O tampão foi mantido sob agitação leve e constantemente para favorecer a renaturação da proteína. Ao final, a solução contendo a amostra reenovelada foi filtrada em membrana de 0,22 µm e submetida a purificação em coluna de níquel.

## **3.4 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

As proteínas recombinantes foram purificadas por meio da combinação de diferentes passos cromatográficos. Os diferentes métodos foram baseados em cromatografia de afinidade ao níquel, troca iônica e cromatografia de exclusão por tamanho.

### **3.4.1 Purificação com resina de níquel**

As frações solúveis foram incubadas com 100 µL de resina de níquel (Ni-NTA Agarose – ThermoScientific), previamente equilibrada (3 lavagens com 1 mL de tampão A - 0,1 M de Tris-HCl, 0,5 M de NaCl, 20 mM de imidazol, pH 7,5). A incubação com 2 mL de cada amostra foi feita por 1 hora, a 4°C, sob agitação constante. Realizou-se a centrifugação das amostras a 100 xg por 1 minuto para coleta da fração não-ligada. Em seguida, foram feitas três lavagens com 1 mL de tampão A. Por fim, adicionou-se 500 µL de tampão B (0,1 M de Tris-HCl, 0,5 M de NaCl, 1 M de imidazol, pH 7,5) em cada amostra. Após 10 minutos de incubação a 4°C, sob agitação, os sobrenadantes foram coletados e analisados por meio de SDS-PAGE e imunodeteção.

Para purificação em bomba peristáltica, foi utilizada a coluna HisTrap HP 1 mL (afinidade ao níquel). Após equilíbrio (passagem de 5 mL de tampão A, 5 mL de tampão B e 10 mL de tampão A), injetou-se a amostra filtrada. A passagem da amostra foi feita em um fluxo de 0,5 mL por minuto. Após passagem da amostra, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão A, com 20 mM de imidazol, para remoção das proteínas fracamente ligadas à resina. Em seguida, iniciou-se a etapa de eluição, onde 5 volumes de coluna de tampão A com crescentes concentrações de imidazol (50, 100, 300, 500 e 1.000 mM) foram passados pela coluna. As frações de eluição foram coletadas em alíquotas de 1 mL e armazenadas a -20°C.

### **3.4.2 Cromatografia de afinidade em sistema semi-automatizado**

Para purificação por afinidade ao níquel, os *pellets* foram descongelados e ressuspendidos em tampão A (3 mL/g) e adicionados de 1 mM de PMSF. As amostras foram lisadas em microfluidificador através de 3 passagens a 600 *psi*. O extrato foi submetido a centrifugação a 12.000 *xg*, por 30 minutos, 4°C. O sobrenadante obtido foi filtrado em membrana de 0,22  $\mu$ m e submetido a purificação por cromatografia de afinidade em coluna HisTrap HP 1 mL em cromatógrafo ÄKTA Avant. Adotou-se um fluxo de 0,5 mL por minuto para ligação da amostra à resina em tampão A (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 300 mM de NaCl, 20% de Glicerol, 20 mM de Imidazol). Após lavagem com 10 volumes de coluna, as amostras foram eluídas por meio de gradiente de tampão B (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 300 de mM NaCl, 20% de Glicerol, 1 M de Imidazol). As frações de eluição foram coletadas, analisadas em gel de poliacrilamida e dialisadas para remoção do imidazol.

Para purificação por cromatografia de exclusão por tamanho, utilizou-se a coluna Sephacryl S-200 High Resolution de 320 mL. Injetou-se na coluna 10 mL de amostra de proteína proveniente da etapa de purificação por afinidade ao níquel. A amostra foi passada pela coluna em um fluxo de 1 mL por minuto, e os picos foram coletados para análise.

Para purificação por cromatografia de troca aniônica em coluna TMAE Hicap 1 mL, a coluna foi equilibrada com tampão A (50 mM de Tris-HCl, pH 8,0). O total de 8 mL amostra proveniente de purificação por afinidade foi diluída em tampão A para uma concentração final de sal de 20 mM. Após passagem da amostra, a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de tampão A, e em seguida foi feita a eluição da amostra com gradiente crescente de contração de tampão B (50 mM de Tris-HCl, 1 M de NaCl, pH 8,0). As amostras foram armazenadas a -20 °C para análise posterior.

### **3.5 CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO BibA**

Como o intuito de avaliar a estabilidade térmica e o enovelamento da proteína recombinante purificada BibA (rBibA), foram empregadas duas técnicas de caracterização biofísica, compreendendo espectropolarimetria de dicroísmo circular e análise da mudança da fluorescência intrínseca da proteína por meio da exposição de resíduos de triptofano e tirosina.

### **3.5.1 Dicroísmo circular**

O espectro de dicroísmo circular (CD) da proteína recombinante BibA, para determinação do conteúdo de estrutura secundária da proteína, foi coletado em um espectropolarímetro Jasco J-810 (Jasco Inc., Easton, MD), no Centro de Biotecnologia, Laboratório de Biotecnologia Molecular I do Instituto Butantan. A amostra foi analisada em tampão fosfato 20 mM em uma cubeta de quartzo (comprimento do percurso 0,2 cm), à temperatura ambiente. Os dados foram relatados como elipticidade molar média de quatro varreduras acumuladas ( $[\theta]$  ° M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), em comprimentos de onda entre 190 e 240 nm. A plotagem foi obtida após análise de K2D3.

### **3.5.2 Determinação da estabilidade térmica em sistema Tycho**

Com o intuito de avaliar a qualidade da proteína BibA e verificar a estabilidade da mesma, a proteína foi diluída para uma concentração de 0,2 μM e 10 μL foram adicionados a capilares de vidro. Os capilares foram alocados no equipamento Tycho™ NT.6 (NanoTemper Technologies) e submetidos a aquecimento de 35 a 95°C em 3 minutos. As leituras obtidas a 330 e 350 nm foram coletadas para avaliação da exposição de resíduos de tirosina e triptofano da proteína BibA, correspondente à sua termoestabilidade.

## **3.6. PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL E IMUNIZAÇÃO**

Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional Brasileiro de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB / USP) sob o protocolo número 41/2017. Os camundongos Balb/c e C57BL/6 foram obtidos na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Cinco animais por gaiola foram alojados e criados no Biotério da Microbiologia. Comida e água foram fornecidas *ad libitum*. Os cuidados com os

animais e os procedimentos experimentais foram realizados em conformidade com as diretrizes do Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais.

### **3.6.1 Produção de soro policlonal**

Realizou-se a produção de soro policlonal para reconhecimento das cepas de GBS dos sorotipos Ia (A909, ATCC BAA-1138) e V (2603 V/R, ATCC BAA-611) de GBS e contra as proteínas recombinantes Sip e BibA. Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c, livres de patógenos específicos, com 5 semanas de idade (5 animais por grupo). O regime vacinal consistiu na administração de 15 µg de cada antígeno proteico ou  $1 \times 10^8$  UFC de GBS, ambos associados a 1 µg do adjuvante LT-1 (toxina termo lábil de *E. coli*). Os animais foram inoculados 3 vezes, com intervalos de 14 dias, através da administração da formulação vacinal por via subcutânea, em um volume final de 100 µL.

Para monitoramento dos títulos de anticorpos gerados contra os antígenos utilizados, realizou-se a coleta de amostras de sangue de cada animal através de sangria pelo plexo submandibular um dia antes de cada imunização e 14 dias após a administração da terceira dose. Após coleta, o sangue foi incubado por 15 minutos a 37°C, seguido de incubação em gelo por 20 minutos e centrifugado a 5.000 rpm, 30 minutos a 4°C para obtenção do soro. As amostras de soro foram transferidas para novos tubos e armazenadas a -20°C para uso posterior.

### **3.6.2 Imunização de camundongos da linhagem C57BL/6**

Para realizar experimentos com o modelo animal para colonização vaginal e desafio letal, camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, livres de patógenos específicos, com 5 semanas de idade (n = 5 animais por grupo), foram submetidos a um regime vacinal de três doses, como descrito no item anterior. As seguintes formulações vacinais foram administradas:

**a) via subcutânea (s.c.):** como controle, os animais foram imunizados por via s.c. com 20 µg de rBibA e 50 µg de Al(OH)<sub>3</sub> (Rehydragel, Reheis), em um volume final de 50 µL.

**b) via intranasal (i.n.):** i) 20 µg de rBibA, ii) 20 µg de rBibA e 8,3 µg de adjuvante LTK63R, iii) 20 µg de rBibA e 5 µg de α-GalCer (KRN7000, ressuspendido em PBS 1X, concentração final de 1µg/µL), iv) 20 µg de rBibA associada a 13,3 µg de lipossoma neutro (preparado como descrito no item 3.7.2.1), v) 20 µg de rBibA associada a 13,3 µg de lipossoma neutro e



5 µg de α-GalCer, vi) grupo controle, imunizado com solução salina. As formulações vacinais foram administradas via i.n., utilizando uma micropipeta, em um volume final de 10 µL.

**c) via vaginal:** i) 20 µg de rBibA e 5 µg de α-GalCer, ii) 20 µg de rBibA associada a 13,3 µg lipossoma neutro, iii) 20 µg de rBibA associada a 13,3 µg de lipossoma neutro e 5 µg de α-GalCer. As formulações vacinais foram administradas via vaginal, utilizando uma micropipeta, em um volume final de 10 µL, mantendo os animais imunizados suspensos pela cauda durante 30 segundos após instilação da formulação vaginal no canal vaginal.

Um dia antes de cada imunização e 15 dias após a última dose, amostras de soro foram coletadas por meio de sangria pelo plexo submandibular. Os soros foram obtidos como descrito no item 3.6.1 e armazenadas a -20°C para análise posterior.

#### 3.7.2.1 Preparo de lipossomas (LP)

O Dr. Wesley Luzetti Fotoran (Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Parasitologia do ICB II da USP), nos cedeu gentilmente filmes lipídicos contendo DPPC e colesterol. Para preparo das nanopartículas, 1 mg de filme lipídio foi ressuscitado em 200 µL de lipídeo A (5 mg/mL), dissolvido em clorofórmio. A amostra foi submetida a secagem a 37°C para evaporação do clorofórmio. O filme lipídico foi ressuscitado em 250 µL de PBS 1X e incubado a 50°C, sob agitação (aparência turva). 300 µg de proteína BibA foram incubadas com 200 µg de lipossoma, sonicados por 5 minutos (30 segundos ligado e 30 segundo desligado), a uma amplitude de 10%. Após esse período, parte dos lipossomas foi incubada com 5 µg de α-GalCer, seguido de imunização.

### 3.7 RECONHECIMENTO DOS ANTÍGENOS PROTEICOS

#### **3.7.1 Reconhecimento dos antígenos por imunodeteção em placa (ELISA)**

Primeiramente, a placa de ELISA foi sensibilizada com 100 ng de proteína recombinante por poço em tampão carbonato, sendo incubada por 18 horas, a 4°C. Após essa etapa, os poços foram lavados 2 vezes com 200 µL de tampão PBS-Tween e então bloqueados com 200 µL da solução de BSA a 1% por 2 horas a 37°C. Os poços foram novamente lavados 2 vezes com 200 µL de tampão PBS e adicionados da solução contendo o anticorpo policlonal anti-GBS do sorotipo V diluído em PBS-Tween. A incubação com o anticorpo foi realizada por 1 hora à temperatura ambiente. Após incubação, os poços foram lavados com PBS-Tween

e adicionados de 100  $\mu$ L da solução contendo o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (RI23589, SIGMA) na diluição de 1:5.000. A incubação foi mantida por 1 hora à temperatura ambiente.

Após incubação com o anticorpo secundário, os poços foram novamente lavados com PBS-Tween e então adicionados de 200  $\mu$ L do substrato para a peroxidase (5 mg de OPD, 5  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio e 12 mL de tampão citrato). As amostras foram incubadas com o substrato ao abrigo da luz por 15 minutos, seguida de adição de 50  $\mu$ L de ácido sulfúrico 3N por poço para inativação a enzima peroxidase. A placa foi lida em equipamento Biotek Synergy H1 Hybrid Reader, a 450 nm (nanômetros). Os títulos de anticorpos foram definidos como a maior diluição da amostra capaz de gerar 0,2 absorbância acima dos soros pre-ímmunes utilizando o gráfico de dispersão (Microsoft Excel), com equação da reta e regressão linear ( $R^2 > 0,96$ ).

Também foram realizados ensaios de ELISA utilizando a bactéria intacta para sensibilização do ensaio. Para isso, culturas na fase estacionária ( $DO_{600nm}$  1) foram lavadas 2 vezes com PBS 1X e diluídas para uma  $DO_{600nm}$  de 0,5. Os poços da microplaca foram sensibilizados com 100  $\mu$ L dessa amostra, seguido de incubação por 18 horas a 37°C. O restante do ensaio foi conduzido como descrito anteriormente.

### **3.7.2 Reconhecimento das proteínas Sip e BibA por *western blot***

Para verificar se as proteínas estavam sendo expressas como esperado, realizou-se um ensaio de *western blot*. Primeiramente, em gel de poliacrilamida a 12,5% carregou-se 10  $\mu$ L das proteínas recombinante (aproximadamente 150 ng), previamente aquecida a 95°C por 5 minutos com 3,5  $\mu$ L de tampão de amostra de proteína. Após separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por 90 minutos a 100 mA. Após transferência, as membranas foram bloqueadas por 1 hora com solução de leite 3%, seguido de lavagem com PBS e incubação por 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo primário monoclonal  $\alpha$ -histidina na diluição de 1:3.000 (27-4710-01 - GE Healthcare).

As membranas foram lavadas novamente com PBS e então incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase na diluição de 1:3.000 por 1 hora. Após incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas com PBS e então submetidas à revelação com o substrato quimioluminescente *SuperSignal™ West Pico PLUS* (ThermoFischer), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.7.3 Ensaio de afinidade antígeno-anticorpo

O índice de afinidade dos anticorpos ao antígeno BibA foi medido usando um protocolo ELISA com a incorporação de uma etapa adicional de dissociação com tiocianato de amônio. As placas foram sensibilizadas com 200 ng da proteína rBibA e incubadas por 18 horas, a 4°C. As amostras de soro, coletadas de camundongos imunizados, foram testadas em diluições correspondentes a uma densidade óptica de 1 (DO<sub>492nm</sub>). Após a incubação, 100 µL de uma solução de tiocianato de amônio (concentrações de 0 a 5 M) foi adicionada aos poços da microplaca. A placa foi mantida ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, por 15 min. Os poços foram lavados e incubados com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (HRP) (RI23589, SIGMA), na diluição de 1:3.000. A porcentagem de anticorpos ligados à rBibA foi determinada pela DO<sub>492nm</sub> registrada nas amostras tratadas com tiocianato de amônio  $\times 100/DO_{492nm}$  da mesma amostra mantida na ausência de tiocianato de amônio. Os valores obtidos com amostras de soro representam o índice de afinidade de anticorpos.

## 3.8. PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS *in vitro* COM GBS

Para determinação da funcionalidade dos anticorpos gerados após imunização de camundongos com as proteínas recombinantes, buscou-se a padronização de diferentes ensaios *in vitro* correspondentes a diferentes etapas do processo de infecção ocasionado pelo GBS.

### 3.8.1 Formação de biofilme

Foram testados diferentes protocolos para estabelecimento da melhor condição para desenvolvimento de ensaios de formação/inibição de biofilme por GBS em microplaca.

**a. Meio basal:** utilizou-se como base o protocolo descrito por Loo e colaboradores (2000), utilizado para obtenção de biofilme para *Streptococcus gordonii*. Primeiramente, as culturas bacterianas de GBS sorotipo V e sorotipo Ia foram crescidas por 18 horas, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, em meio THB (*Todd Hewitt Broth*). Transferiu-se 1,5 mL das culturas para novos tubos contendo 8,5 mL de meio THB. As culturas foram incubadas novamente a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por aproximadamente 2 horas até atingirem uma DO<sub>600nm</sub> de 0,8. As culturas foram então centrifugadas e ressuspensas em um mesmo volume de meio BM – *biofilm medium* (meio basal, aminoácidos, vitaminas, sais e glicose). Realizou-se o plaqueamento de 200 µL das culturas puras e 200 µL das culturas

diluídas 1:100, em triplicata, em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 24, 48 e 72 horas, a 37°C, anaerobicamente. Após respectivo período de incubação, a fase planctônica foi aspirada. Realizou-se a etapa de fixação em metade das placas do ensaio, com 200 µL de paraformaldeído 4% por 30 minutos, a 4°C. Após lavagem por imersão em H<sub>2</sub>O destilada, realizou-se a incubação com 100 µL de cristal violeta 0,5% por 15 minutos, seguido de 2 lavagens com água destilada. Em seguida, adicionou-se 200 µL de solução de ácido acético 33% (v/v). Após três ciclos de pipetagem, transferiu-se o sobrenadante para uma placa de ELISA para leitura do ensaio em espectrofotômetro a 540 nm.

**b. THB e RPMI:** foram utilizados para cultivo de GBS os meios THB e RPMI, nas seguintes condições i) pH 7,8, ii) pH 5,0 e iii) pH 7,8 mais 1% de glicose. Colônias crescidas por 18 horas em placas de ágar sangue foram diluídas nos respectivos meios de cultura e ajustadas para uma DO<sub>600nm</sub> de 0,05. Em microplaca de 96 poços, adicionou-se em triplicata 100 µL de cada cultura bacteriana. A placa foi selada e incubada sob agitação de 60 rpm, por 8 horas a 37°C. Os meios de cultura foram substituídos por meio fresco, seguido de incubação a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas. Após esse período, os meios de cultura foram removidos por inversão e os poços foram lavados 2 vezes com 200 µL de água destilada. Realizou-se a incubação com 100 µL de cristal violeta 0,5% por 15 minutos, seguido de 2 lavagens com H<sub>2</sub>O destilada. Em seguida, adicionou-se 200 µL de solução de ácido acético 33% (v/v). Após três ciclos de pipetagem, transferiu-se o sobrenadante para uma placa de ELISA para leitura do ensaio em espectrofotômetro a 540 nm.

### **3.8.2 Imunofluorescência**

Culturas de GBS crescidas por 18 horas a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, foram lavadas duas vezes com tampão PBS 1X. Em placa de fluorescência de 96 poços, adicionou-se 30 µL da cultura lavada. As amostras foram fixadas por meio da adição de 170 µL de paraformaldeído 4%, seguido de incubação por 30 minutos, a 4°C. Após duas lavagens, realizou-se o bloqueio dos poços pela adição de 200 µL de solução de leite a 3%, seguida de incubação a 37°C por 30 minutos. Após lavagens, 100 µL da diluição 1:100 de cada soro policlonal (anti-GBS Ia, anti-GBS V, anti-Sip e soro negativo) foi adicionada aos poços. A incubação foi realizada por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagens, adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a Alexa 488 na diluição de 1:100. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, os poços foram novamente lavados e então adicionados de 100 µL de solução de Hoescht a 1 µg/mL, para

coloração de ácidos nucleicos. A incubação foi realizada por 10 minutos, seguida de lavagem e visualização em microscópio de fluorescência *AMG EVOS fl LED Fluorescent Microscope*.

### **3.8.3 Opsonofagocitose**

Ensaio de morte por opsonofagocitose (OPKA) foram realizados com soros coletados de camundongos imunizados como descrito anteriormente por Guttormsen e colaboradores (2008), com modificações. Alíquotas contendo  $1 \times 10^5$  células da linha J774 de macrófagos (ATCC, CCL-240), cultivadas em Meio Eagles Modificado (DMEM), foram plaqueadas em microplaca de 96 poços (Nunc). As placas foram incubadas por 18 horas, a 37°C, em uma atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. GBS-V cultivado em caldo THB foi inoculado em meio fresco e incubado a 37°C, até atingir uma densidade óptica de 1 (DO<sub>600nm</sub>). As células bacterianas foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em meio DMEM.

$2 \times 10^3$  UFC de GSB-V foram incubadas com os soros-teste inativados por calor (56°C, 30 minutos), na diluição de 1:16, na presença de 12,5% de fonte de complemento (soro de camundongo *naïve* fresco) e gelatina a 1%, em solução salina equilibrada de Hank (HBSS), por 30 minutos, a 37°C. Após esse período, as reações foram incubadas com as células efetoras por 90 minutos. As reações controle foram realizadas com soros provenientes de imunização com salina ou de ensaios sem células de GBS-V. Após incubação, os sobrenadantes das triplicatas foram coletados, submetidos a diluição seriada e semeados em placas de ágar-sangue com 8 µg/mL de gentamicina e 15 µg/mL de ácido nalidíxico. As colônias foram contadas após 24 horas de incubação a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A porcentagem de bactérias mortas foi determinada comparando as contagens de colônias que não continham células efetoras (100% de sobrevivência) com as contagens de reações completas, subtraindo a porcentagem que sobreviveu de 100%.

### **3.8.4 Invasão de células epiteliais**

Células epiteliais do pulmão humano A549 (ATCC® CCL-185™) foram transferidas para microplacas de 96 poços (Nunc) a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço. Alíquotas contendo  $5 \times 10^6$  UFC de GBS-V (MOI de 50) foram incubadas com soros policlonais obtidos de camundongos previamente vacinados, na diluição de 1:100, por 45 minutos, a 37°C. As células bacterianas opsonizadas foram incubadas com células A549 por 3 horas, a 37°C sem agitação. Os poços foram lavados com PBS e tratados com 100 µg/mL de gentamicina, por 2 horas para matar células bacterianas ligadas à membrana. As células A549 foram lavadas mais uma vez para remover o antibiótico e subsequentemente lisadas com Triton X-100 a

0,025%. Os lisados foram submetidos a diluição seriada e semeados em placas de ágar-sangue contendo 8 µg/mL de gentamicina e 15 µg/mL de ácido nalidíxico. As colônias foram contadas após 24 horas de incubação a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A avaliação qualitativa da invasão de células A549 foi realizada após o tratamento com gentamicina. As células foram lavadas com PBS e incubadas com 100 µL de uma solução a 50 µg/mL de laranja de acridina e brometo de etídio, por 5 minutos, no escuro. As células foram visualizadas sob o microscópio fluorescente AMG EVOS fl LED.

### 3.9 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

Baços e linfonodos provenientes de animais submetidos ao protocolo de imunização foram coletados e processados para avaliação da produção de citocinas e verificação da proliferação de linfócitos T CD4+, T CD8+ e células B.

#### 3.9.1 Obtenção e processamento de células do baço

Os baços de camundongos imunizados com BibA por via i.n. foram coletados 15 dias após a administração da terceira dose. Com o auxílio de material cirúrgico, em capela de fluxo laminar, os baços removidos foram acondicionados em placas de 6 poços, contendo 2 mL de meio RPMI, suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB). O órgão foi macerado com o auxílio do êmbolo de seringa de 5 mL, filtrado em peneira de 70 µm (*Easy Strainer Greiner Bio One*<sup>®</sup>) e centrifugado a 1.500 xg por 5 minutos. O sedimento celular foi tratado com tampão de lise ACK (123 mM de cloreto de amônio, 8 mM de bicarbonato de potássio, 1 mM de EDTA para 200 mL, esterilizado por autoclavagem), por 2 minutos, para completa ruptura das hemácias. Em seguida, adicionou-se às amostras 3 mL de meio com soro para neutralização do tampão ACK. Após centrifugação, as amostras foram lavadas novamente com 3 mL de meio, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio completo (meio RPMI, 10% de SFB, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 1% v/v solução de aminoácidos não essenciais, 1% v/v solução de aminoácidos essenciais, 1% v/v solução de vitaminas, 55 µM β-mercaptoetanol). As células foram contadas e 3x10<sup>6</sup> células foram plaqueadas em placas de 24 poços, na ausência ou presença de estímulo (5 µg de BibA), anti-CD-28 (2 µg/ml) e IL-2 (5 ng/mL), em meio completo, em um volume final de 500 µL. Poços extras foram preparados para posterior marcação do controle *fmo* (*fluorescence minus one control*). As placas foram incubadas por 3 dias a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.9.2 Obtenção e processamento de células do linfonodo**

Os linfonodos cervicais foram retirados com auxílio de material cirúrgico estéril. Os linfonodos foram passados duas vezes por tubos contendo 1 mL de PBS mais antibióticos penicilina, estreptomicina e gentamicina. Os linfonodos foram macerados por meio de atrito entre duas lâminas de vidro (parte fosca), lavados, centrifugados e ressuspensos em meio completo. As células foram marcadas com 1 mL solução de CFSE (2  $\mu$ M) em PBS por meio de incubação a 37°C por 15 minutos, ao abrigo da luz. As células foram então centrifugadas e lavadas duas vezes com meio completo, ressuspensas e incubadas na presença de IL-2 (5 ng/mL), com ou sem estímulo com 2  $\mu$ g de rBibA. As células foram incubadas por 5 dias, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.9.3 Ensaio de marcação de células para citometria**

Após o período de incubação das amostras de baço ou linfonodo, adicionou-se aos poços teste, incubados com ou sem estímulo, 10  $\mu$ g/mL de brefeldina A (GolgiPlug; BD Biosciences) e 5 ng/ $\mu$ L de IL-2 (Sigma). Os poços contendo as amostras controle *fmo* foram incubados com brefeldina A (10  $\mu$ g/mL), IL-2 (5 ng/mL), PMA (200 pg/poço), monensina (10  $\mu$ g/ml), ionomicina (200 ng/poço), e anti-CD-28 (2  $\mu$ g/ml). Todas as amostras foram incubadas por 8 horas, a 37°C em estufa a 5% CO<sub>2</sub>.

#### 3.9.3.1 Marcação polifuncional de células do baço

Após incubação, as placas foram centrifugadas a 750 xg por 5 minutos, as células foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de tampão MACS (0,5% de BSA, 2 mM de EDTA; PBS 1X, pH 7,2) e transferidas para uma placa de 96 poços de fundo “U” (Corning®). As células foram lavadas mais uma vez com tampão MACS e incubadas por 30 minutos, a 4°C com os anticorpos anti-CD-8 conjugado à BV605, na diluição de 1:300 e anti CD-4 conjugado à APC-H7 (BD Biosciences), em um volume final de 30  $\mu$ L por poço para marcação extracelular. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com tampão MACS e fixadas com 50  $\mu$ L de Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences), por 10 minutos, em gelo. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com a solução Perm/Wash (BD Biosciences) para permeabilização das células, seguida de incubação com os anticorpos para marcação intracelular (anti-IL-4 conjugado à PE, diluição de 1:150, anti-IFN- $\gamma$  conjugado à alexa 700, diluição de 1:500, anti-IL-6 conjugado à FITC, diluição de 1:100, anti-IL-2 conjugado à BV421, diluição de 1:300, anti-TNF- $\alpha$  conjugado à PerCP Cy5.5, diluição de 1:100) em um volume final de 30  $\mu$ L. A incubação foi realizada por 30 minutos, em gelo, ao abrigo da luz.

Após 2 lavagens, as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão MACS e incubadas a 4°C até a leitura do ensaio em citômetro de fluxo. Utilizou-se o aparelho LSRFortessa™ (BD Biosciences) para análise das células com os parâmetros *forward scatter* (FSC)/*side scatter* (SSC) e a porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> produtores de diferentes citocinas. Os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo v10.

### 3.9.3.2 Marcação de linfoproliferação

Como descrito no item anterior, as células foram transferidas para placas de fundo U, lavadas com tampão MACS e incubadas com os respectivos anticorpos por 30 minutos, à 4°C: anti-CD45R (B220) conjugado à APC-Cy7, diluição de 1:150, anti-CD-4 conjugado à PE-Cy5, diluição de 1:200, anti-CD-8 conjugado à BV605, diluição de 1:300. As células foram lavadas duas vezes com tampão MACS, fixadas com 50 µL de Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences), por 10 minutos em gelo, lavadas e armazenadas para análise. Utilizou-se o aparelho LSRFortessa™ (BD Biosciences) para análise das células com os parâmetros *forward scatter* (FSC)/*side scatter* (SSC) e a porcentagem de linfócitos B, T CD-4<sup>+</sup> e T CD-8<sup>+</sup>. Os dados foram analisados com o auxílio do programa FlowJo v10.

## 3.10 DESAFIO LETAL E COLONIZAÇÃO VAGINAL

### **3.10.1 Ativação da virulência de GBS-V**

Para realização dos desafios animais com células de GBS do sorotipo V, realizou-se o processo de ativação de virulência do patógeno por meio de três passagens intraperitoneais em camundongos da linhagem C57BL6 saudáveis, com 10 semanas de idade. Os baços foram coletados de camundongos mortos por choque séptico, tratados por 1 hora e 30 minutos com 100 µg/mL de gentamicina, lavados, macerados e semeados em placas de ágar-sangue contendo 8 µg/mL de gentamicina e 15 µg/mL de ácido nalidíxico .

### **3.10.2 Desafio letal**

Realizou-se a padronização do desafio letal com GBS para determinação das doses letais para morte de 90% da população teste (DL<sub>90</sub>) e de 50% da população teste (DL<sub>50</sub>). Para isso, GBS do sorotipo V foi cultivado em meio THB por 18 horas, a 37°C, em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Realizou-se um subcultivo a partir dessa cultura, inoculado nas mesmas condições descritas anteriormente, até atingir uma DO<sub>600nm</sub> de 1 (aproximadamente 2

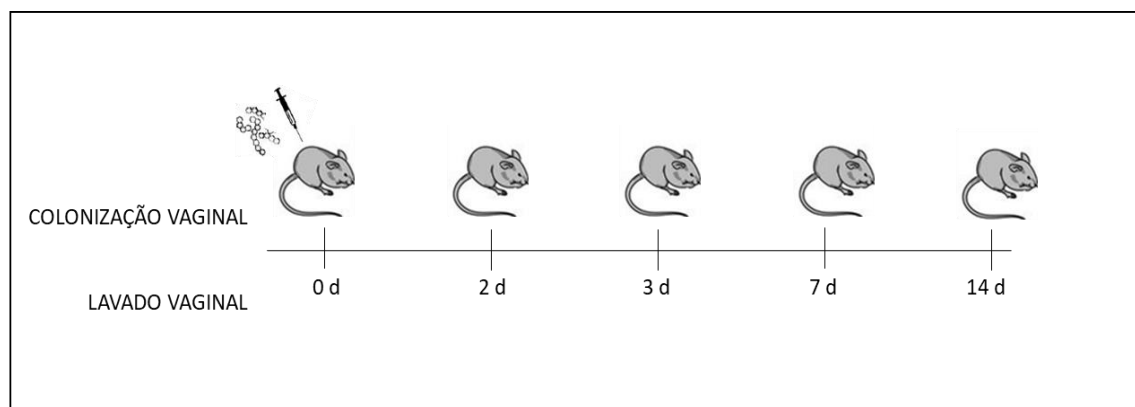


horas de cultivo). As células foram recuperadas e lavadas 2 vezes com solução salina a 0,8%. Realizou-se a diluição seriada dessa amostra e o plaqueamento em duplicata das diluições  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  para determinação do número de unidades formadoras de colônias por mililitro de amostra (UFC/mL).

O desafio foi conduzido em 3 grupos de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (n=10), por meio da inoculação por via intraperitoneal (i.p.) de 100  $\mu$ L de solução bacteriana, contendo  $10^8$ ,  $10^5$  e  $10^4$  UFC. As mortes foram avaliadas diariamente por 10 dias, verificando-se os sinais de doença, como comportamento anormal, diminuição da motilidade e diminuição do apetite. Para realização do desafio letal de animais previamente imunizados, foi administrada por via i.p.  $1 \times 10^8$  UFC por animal.

### 3.10.3 Colonização vaginal

Para realizar a padronização do desafio de colonização vaginal, 4 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram tratados por via i.p. com 0,5 mg de acetato de medroxiprogesterona (Depo-Provera®) para sincronização do ciclo estral. Um dia depois, cada camundongo foi colonizado com  $5 \times 10^7$  UFC de GBS-V, diluído em solução de gelatina a 10%, na proporção de 1: 1, em um volume final de 10  $\mu$ L. Amostras de lavado vaginal foram coletadas nos dias 2, 3, 7, 10 e 14 após colonização (figura 5). Os números de UFC foram determinados por diluição seriada e plaqueamento em ágar-sangue mais antibióticos.



**Figura 5.** Representação esquemática do protocolo de colonização vaginal com GBS utilizado em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6.

Animais previamente imunizados com as diferentes formulações vacinais (n=5 animais por grupo) foram submetidos a sincronização do ciclo estral 14 dias após a administração da terceira dose de imunização. 24 horas após sincronização, os animais foram submetidos a colonização vaginal com  $5 \times 10^7$  UFC por animal. No terceiro e quinto dia após o

processo de colonização vaginal, amostras de lavado vaginal, saliva (induzida por injeção i.p. de 0,5 mL de pilocarpina a 0,2%), fezes e sangue foram coletadas. Os números de UFC foram determinados por diluição seriada e plaqueamento em ágar-sangue mais antibióticos.

#### **3.10.4 Proteção por imunidade passiva**

$5 \times 10^7$  UFC de GBS-V foram opsonizadas por incubação durante 30 min, a 37°C, com soros policlonais provenientes de camundongos imunizados com BibA-Alum, BibA-LTK63R ou imunizados com solução salina (n=10 camundongos por grupo). Os soros foram utilizados em uma diluição correspondente a uma absorbância de 1 ( $DO_{492nm}$ ), no ensaio de tiocianato de amônio, ou 1:100 para o soro controle (grupo salina). Após a opsonização, as bactérias foram centrifugadas, a 5.000 rpm, 5 min, ressuspensas no volume final de 5  $\mu$ L e misturadas com gelatina a 10%, na proporção de 1:1. Cada amostra foi inoculada por via vaginal em camundongos não imunizados. Amostras de lavado vaginal foram coletadas 3 dias após o desafio.

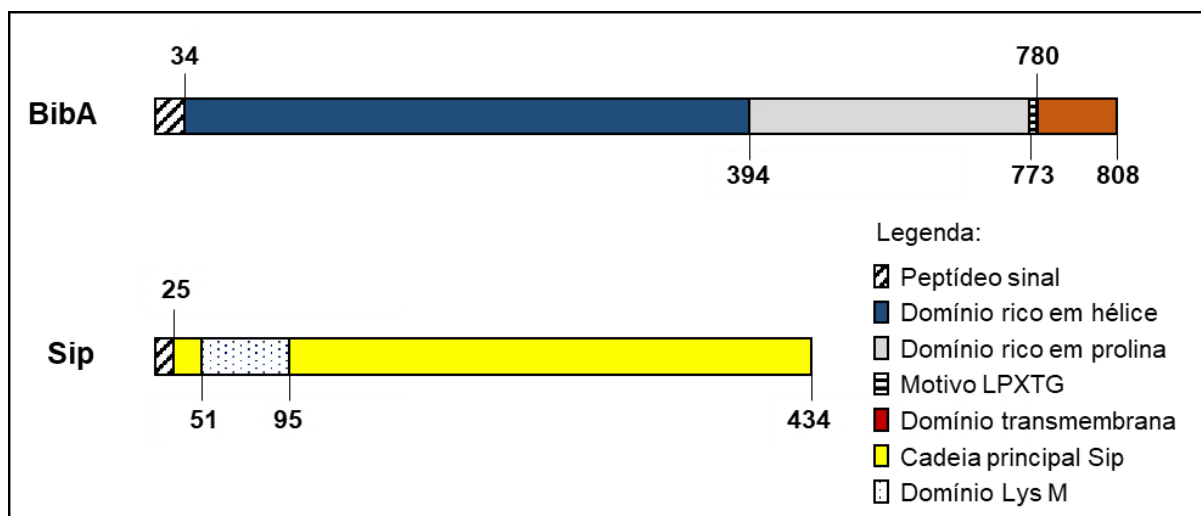
#### **3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad). Os dados foram representados como médias aritméticas  $\pm$  desvio padrão (DP) e as diferenças foram determinadas usando *one-way* ou *two-way* ANOVA (análise de variância unidirecional), com testes de comparações múltiplas de Tukey, Bonferroni e Dunnett.

## 4. RESULTADOS

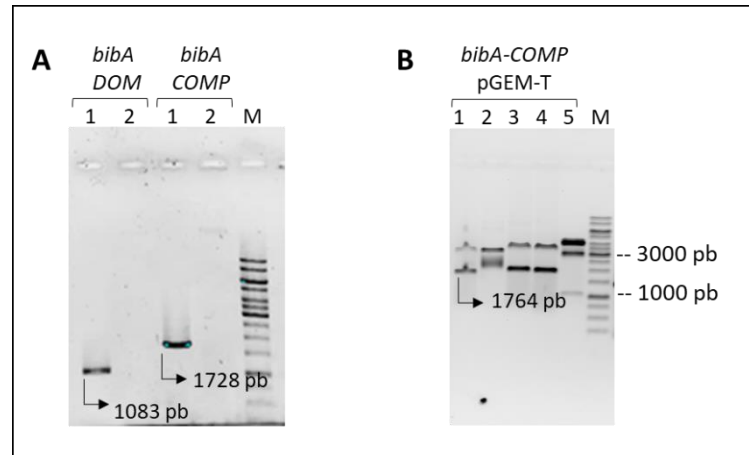
### 4.1 CLONAGEM EM VETORES DE EXPRESSÃO

As proteínas de superfície BibA e Sip, esquematizadas na figura 6, foram escolhidas como antígenos vacinais devido à sua prevalência em diferentes cepas do patógeno. Realizou-se a amplificação do gene *bibA*, tanto do domínio rico em alfa-hélice (aminoácidos 34 ao 394), quanto da proteína inteira (sem o peptídeo sinal e o domínio transmembrana), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na tabela 1, para a clonagem no vetor pET28a.



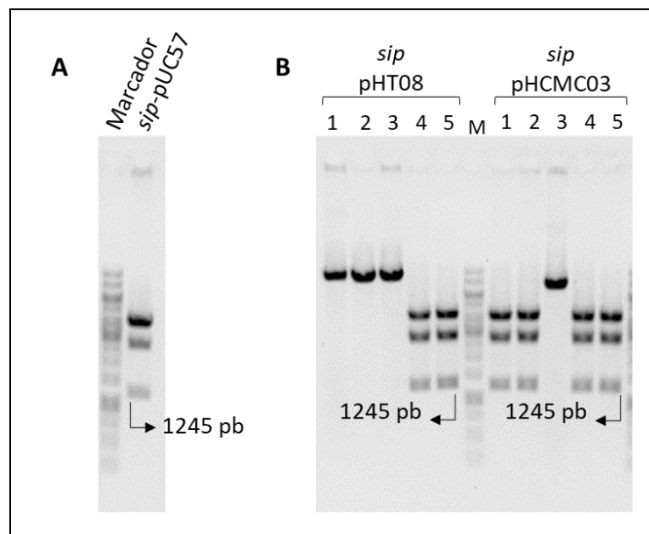
**Figura 6.** Esquematização das proteínas BibA e Sip. Os domínios e motivos conservados estão identificados de acordo com o esquema de cores apresentado na legenda. As sequências originais podem ser encontradas na base de dados NCBI – GenBank, sob os códigos de acesso FJ801024.1 para BibA e WP\_000783419.1 para Sip.

Os produtos obtidos após amplificação podem ser visualizados na figura 7A, correspondentes aos tamanhos esperados. Os produtos de amplificação foram subclonados em vetor pGEM-T, no entanto, somente a ligação com *bibA*-completa resultou em clones positivos (figura 7B). Os clones 1, 3 e 4 foram enviados para sequenciamento. Como o resultado do sequenciamento foi negativo para os três clones, outras tentativas de amplificação foram testadas, mas todas sem sucesso. Por esse motivo, foi feita a solicitação do gene sintético contendo a sequência completa do gene *bibA*.



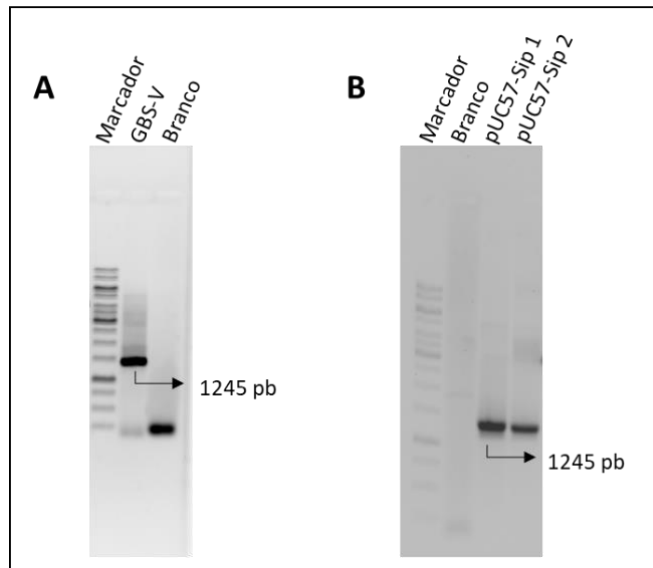
**Figura 7.** Amplificação e subclonagem de fragmentos do gene *bibA*. **A. *bibA* DOM:** 1 – amplificação do domínio rico em hélice de 1.083 pares de bases (aminoácidos 34 ao 394); ***bibA* COMP:** 1 – amplificação do gene *bibA* completo, fragmento com 1.728 pares de bases. Em ambos os casos, a amplificação foi feita a partir do DNA genômico do sorotipo V de *S. agalactiae*, sendo 2 o controle negativo de cada reação de PCR. **B.** Digestão com as enzimas *NdeI* e *XhoI* dos clones obtidos após subclonagem do gene *bibA* completo em pGEM-T; os clones 1, 3 e 4 foram positivos para a presença do inserto. M – marcador O'gene ruler 1 kb. Geis corados com *GelRed*.

Em paralelo, o plasmídeo contendo o gene sintético codificador para a proteína Sip foi digerido com *BamHI* e *XbaI* para liberação do inserto (figura 8A). O fragmento de 1.245 pares de base foi purificado e submetido à ligação com os plasmídeos pHT08 e pHCMC03 para expressão em *B. subtilis*. Os produtos das ligações foram introduzidos em células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Colônias foram selecionadas para extração do DNA plasmidial, e a confirmação da ligação foi obtida a partir de digestão dos plasmídeos com as enzimas *XbaI* e *BamHI* e a liberação do fragmento de 1.245 pares de base (figura 8B).



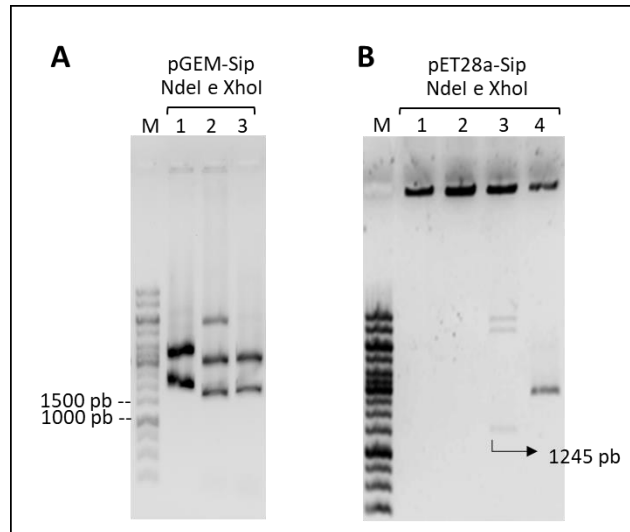
**Figura 8.** Clonagem do gene *sip* em vetores de expressão. **A.** Digestão do plasmídeo pUC57 com as enzimas *XbaI* e *BamHI* para liberação do gene codificador para a proteína Sip de *S. agalactiae*. **B.** *Screening* de clones obtidos após a transformação da linhagem com o produto das ligações nos plasmídeos pHT08 e pHCMC03 com as enzimas *XbaI* e *BamHI*. Clones 4 e 5 positivos para a ligação com pHT08 e clones 1, 2, 4 e 5 positivos para a ligação com pHCMC03. M – marcador O'gene ruler 1 kb. Geis corados com *GelRed*.

A amplificação do gene *sip* para clonagem no vetor pET28a foi realizada com sucesso, tanto a partir do DNA genômico de GBS sorotipo V (figura 9A), quanto a partir do gene sintético (figura 9B). Em ambos os casos pode ser confirmada a amplificação do gene pela identificação do produto de 1.245 pares de bases.



**Figura 9.** Amplificação do gene *sip* a partir de vetores recombinantes. **A.** GBS-V - amplificação a partir do DNA genômico de *S. agalactiae* sorotipo V; Branco - controle negativo da reação. **B.** Branco - controle negativo da reação; pUC57-Sip 1 - amplificação a partir do plasmídeo original sintetizado pela GenScript; pUC57-Sip 2 - amplificação a partir do plasmídeo obtido após propagação em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Marcador - O'gene ruler 1 kb. Géis corados com *GelRed*.

Após subclonagem do gene em pGEM-T, verificou-se por meio de análise de restrição com *NdeI* e *XhoI* a presença de clones positivos para o gene *sip* (figura 10A). Os clones foram enviados para sequenciamento, sendo confirmada a sequência correta do gene *sip* para os clones 2 e 3. O clone 3 foi escolhido para subclonagem em vetor de expressão pET28a. Após análise de restrição dos clones obtidos em pET28-a, confirmou-se a presença do inserto apenas no clone 3 (figura 10B). A análise da sequência Sip clonada em pET28a (ferramenta online *Expasy Prot Param*), resultou em uma proteína de 430 aminoácidos, com um pI teórico de 6.74, peso molecular de 45,2 kDa e um coeficiente de extinção molar de 35.870.



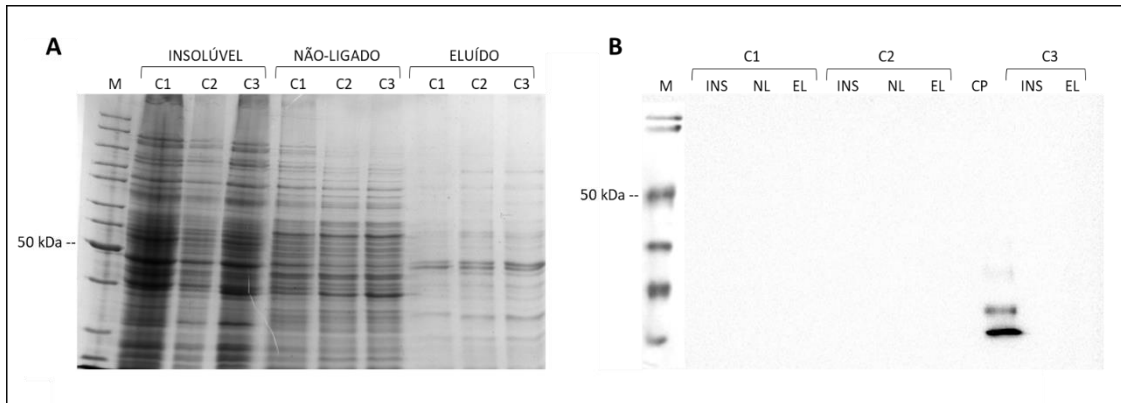
**Figura 10.** Análise de restrição de vetores obtidos após a clonagem do gene *sip*. **A.** Subclonagem do gene *sip* em pGEM-T: clones 1, 2 e 3 digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, M – marcador de peso molecular. **B.** Clonagem do gene *sip* em pET28a: clones 1, 2, 3 e 4 digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, M – marcador de peso molecular O'gene ruler 1 kb. Clone 3 positivo para a presença do inserto de 1245 pares de bases. Géis corados com *GelRed*.

Após obtenção das clonagens do gene *sip* nos plasmídeos pET28a, pHT08 e pHCMC03 e com chegada do gene sintético *bibA* em pET28a, deu-se início à etapa de expressão das proteínas recombinantes. Para isso os plasmídeos foram transformados nas respectivas cepas de *E. coli* e *B. subtilis*.

## 4.2 EXPRESSÃO DOS ANTÍGENOS VACINAIS Sip E BibA

### 4.2.1 Teste de expressão da proteína Sip e *B. subtilis* 1012

O processo de obtenção de células competentes de *B. subtilis* foi um fator limitante para o desenvolvimento de testes de expressão nesse modelo. Várias tentativas foram realizadas, incluindo variações na densidade óptica da cultura utilizada para congelamento das alíquotas em meio HS, ou mesmo no crescimento das células em meio LS, abrangendo desde a fase logarítmica até a fase estacionária. Diferentes concentrações de DNA utilizadas nas transformações também foram testadas, no entanto, só foi possível obter células transformadas em *B. subtilis* 1012, com o plasmídeo pHT08-Sip. Realizou-se o teste de expressão dos 3 clones obtidos. Como pode ser visualizado na figura 11, mesmo com indícios da presença da proteína na fração insolúvel dos clones induzidos (banda de 45,2 kDa), a mesma não foi detectada por ensaio de *western blot*, seguido por imunodeteção com anticorpo monoclonal anti-histidina, para reconhecimento da cauda de histidina da proteína recombinante.

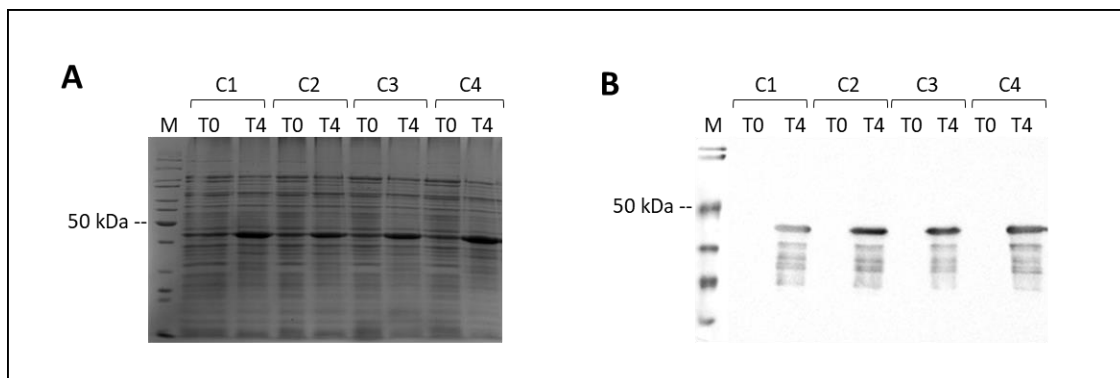


**Figura 11.** Teste de expressão da proteína Sip em *B. subtilis*. **A.** Gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com *Coomassie blue*, apresentando as frações insolúveis, não-ligadas à resina de níquel e eluídas da resina com 1 M de imidazol, dos clones 1, 2 e 3 transformados com o plasmídeo pHT08-Sip. **B.** *Western blot* com amostras obtidas das frações insolúveis (INS), não-ligadas (NL) ou eluídas (EL) da expressão em *B. subtilis*, transformado com pHT08-Sip, com anticorpo monoclonal anti-histidina, onde C1, C2 e C3 se referem aos clones testados, CP - controle positivo contendo a proteína  $\Delta$ NS1 do vírus Dengue e M - marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*.

Devido à ineficácia do teste de expressão da proteína Sip em *B. subtilis*, testamos a expressão da proteína em cepas de *E. coli*, como alternativa para obtenção do antígeno vacinal.

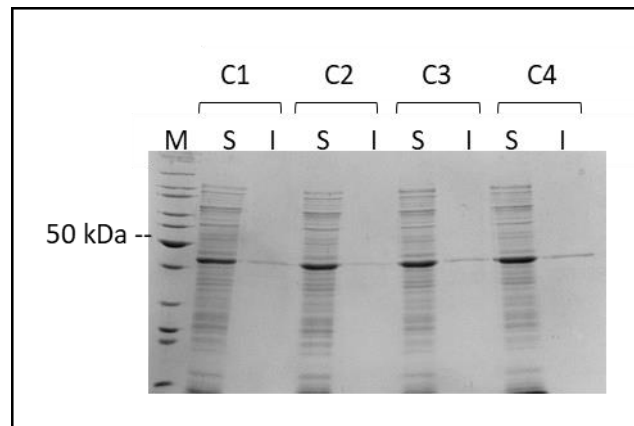
#### 4.2.2 Teste de expressão da proteína Sip em *E. coli*

Foi possível confirmar a expressão da proteína Sip em células de *E. coli* BL21(DE3). Verificou-se que a indução da cultura bacteriana com 0,5 mM de IPTG proporcionou a expressão da proteína após 4 horas de cultivo a 37°C em meio TB (figura 12A). Pela técnica de *western blot*, foi possível confirmar o reconhecimento da proteína recombinante utilizando o anticorpo monoclonal anti-histidina, revelando a presença de bandas de aproximadamente 45 kDa (figura 12B).



**Figura 12.** Teste de expressão da proteína Sip por linhagens recombinantes de *E. coli*. **A.** Gel de poliacrilamida a 12,5% corado com *Coomassie blue* dos tempos 0 (T0), prévios à indução do promotor com 0,5 mM de IPTG, e os tempos 4 (T4), quatro horas após a indução da expressão da proteína. Foram avaliados quatro clones (C1 a C4). **B.** *Western blot* das amostras T0 e T4 dos quatro clones induzidos, utilizando o anticorpo monoclonal anti-histidina, resultando na identificação de uma proteína de aproximadamente 45 kDa.

Após a confirmação da expressão da proteína Sip, foi avaliado se a mesma estava sendo expressa na fração solúvel (citoplasma), ou na fração insolúvel (corpos de inclusão) dos extratos celulares. Portanto, as culturas induzidas foram submetidas à lise e avaliadas por meio de SDS-PAGE (figura 13). A expressão da proteína recombinante foi obtida predominante na fração solúvel (S), após indução nas condições descritas anteriormente.

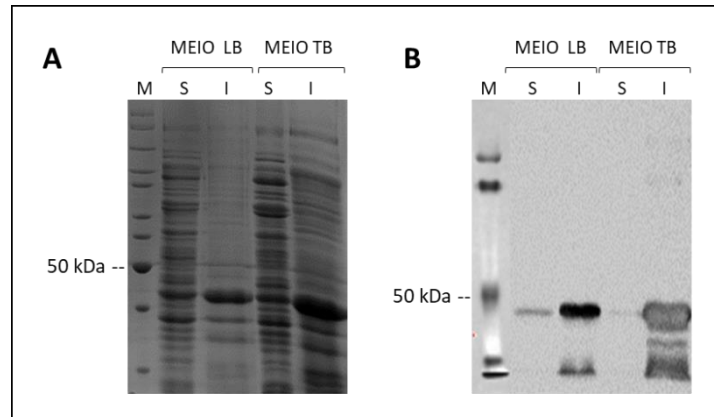


**Figura 13.** Avaliação da expressão da proteína Sip nas frações solúvel e insolúvel dos extratos celulares. Gel de poliacrilamida 12,5%, corado com *Coomassie blue*. C1 a C4 – clones testados, S – fração solúvel, I – fração insolúvel e M – marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder*.

#### 4.2.3 Produção da proteína Sip em linhagens de *E. coli*

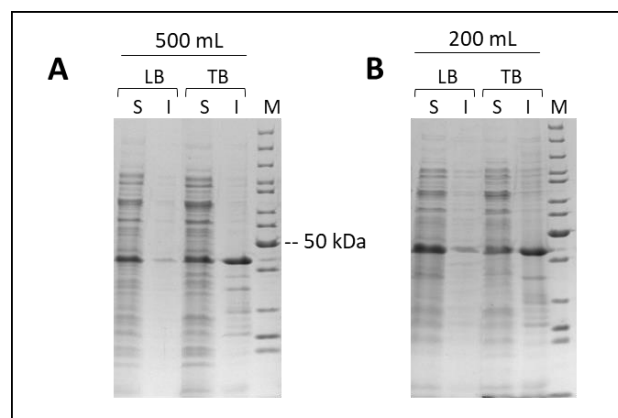
Para verificar se a proteína continuaria sendo expressa na fração solúvel após aumento da escala de indução da cultura bacteriana, foram testadas diferentes condições de indução e outras cepas de expressão. Foi possível verificar que a tendência de insolubilização da proteína Sip foi maior quando a proteína foi induzida em volumes maiores, como em 500 mL (figura 14A). A insolubilidade ocorreu mesmo com a diminuição da temperatura de indução (18°C) e uso de menor concentração de IPTG (0,25mM). Além disso, foi possível avaliar que em meio TB quase não se verifica a presença de proteína na fração solúvel após indução nessas condições (figura 14B).





**Figura 14.** Teste de expressão da proteína Sip. Culturas de 500 mL de meio induzidas a 18°C por 18 horas com 0,25 mM de IPTG. **A.** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com *Coomassie blue* e **B.** *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-histidina, apresentando as frações solúveis (S) e insolúveis (I) da proteína Sip obtidas após cultivo em meios LB e TB. M – marcador de peso molecular *PageRuler Unstained Protein Ladder*.

Visando a expressão da proteína Sip na fração solúvel, foram alterados alguns parâmetros na etapa de indução. Foi possível conseguir uma melhora na quantidade de proteína presente na fração solúvel (S) por meio de indução de 500 mL de cultura com 0,25 mM de IPTG, por 2 horas, a 37°C, em meio LB (figura 15A). O mesmo pode ser observado após indução de 200 mL de cultura com 0,5 mM de IPTG, por 4 horas, a 37°C (figura 15B). Em ambos os casos, as induções em meio TB resultaram em uma maior proporção de proteína na fração insolúvel (I).

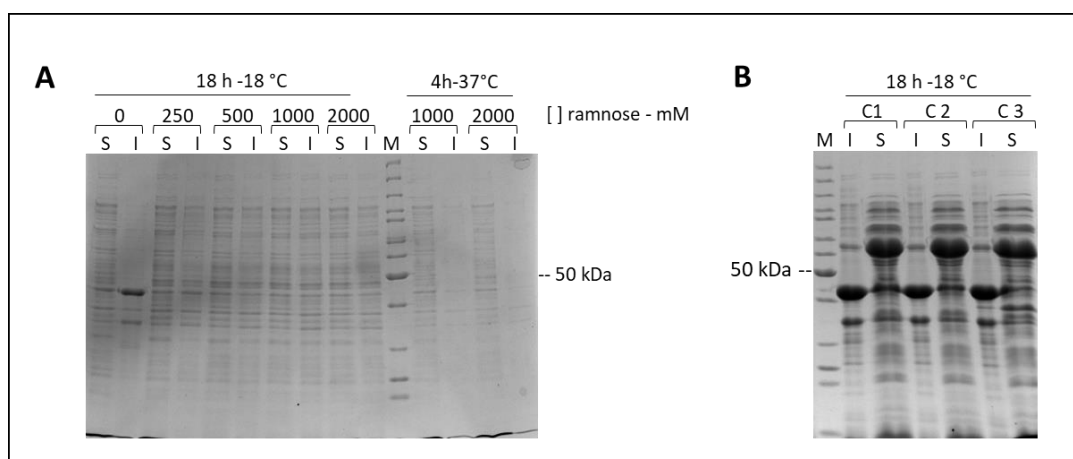


**Figura 15.** Expressão da proteína Sip recombinante nas frações solúveis (S) e insolúveis (I) de extratos bacterianos após cultivo em meios LB e TB. **A.** Indução de Sip em 500 mL de meio LB ou TB, com 0,25 mM de IPTG, por 2 horas a 37°C. **B.** Indução de Sip em 200 mL de meio LB ou TB com 0,5 mM de IPTG, por 4 horas a 37°C. M – marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*. Géis de poliacrilamida a 12,5%, corados com *Coomassie blue*.

Devido à obtenção de maior quantidade de proteína na fração solúvel por meio da indução da expressão da proteína Sip em 200 mL de cultivo, com 0,5 mM de IPTG, essa

condição foi adotada para realização da produção do antígeno para os testes de purificação e posterior imunização em modelo animal.

Além de testar condições de expressão utilizando a cepa de *E. coli* BL21 (DE3), também foram realizados testes de expressão nas cepas de *E. coli* Lemo21 (DE3) e Arctic Express (DE3). Essas cepas foram avaliadas com o intuito de se obter maior quantidade da proteína Sip na fração solúvel após indução, já que a Arctic é capaz de expressar chaperoninas que auxiliam no enovelamento de proteínas e a Lemo possui um controle de expressão altamente regulado pela concentração de raminose. Como pode ser verificado na figura 16A, a expressão em Lemo não foi satisfatória, de modo que a proteína Sip só foi identificada na fração insolúvel, na ausência de raminose. A expressão de Sip na cepa Arctic rendeu uma alta quantidade de proteína, mas toda ela concentrada na fração insolúvel (16B). Portanto, não houve vantagem na utilização dessas cepas para expressão da proteína de interesse.

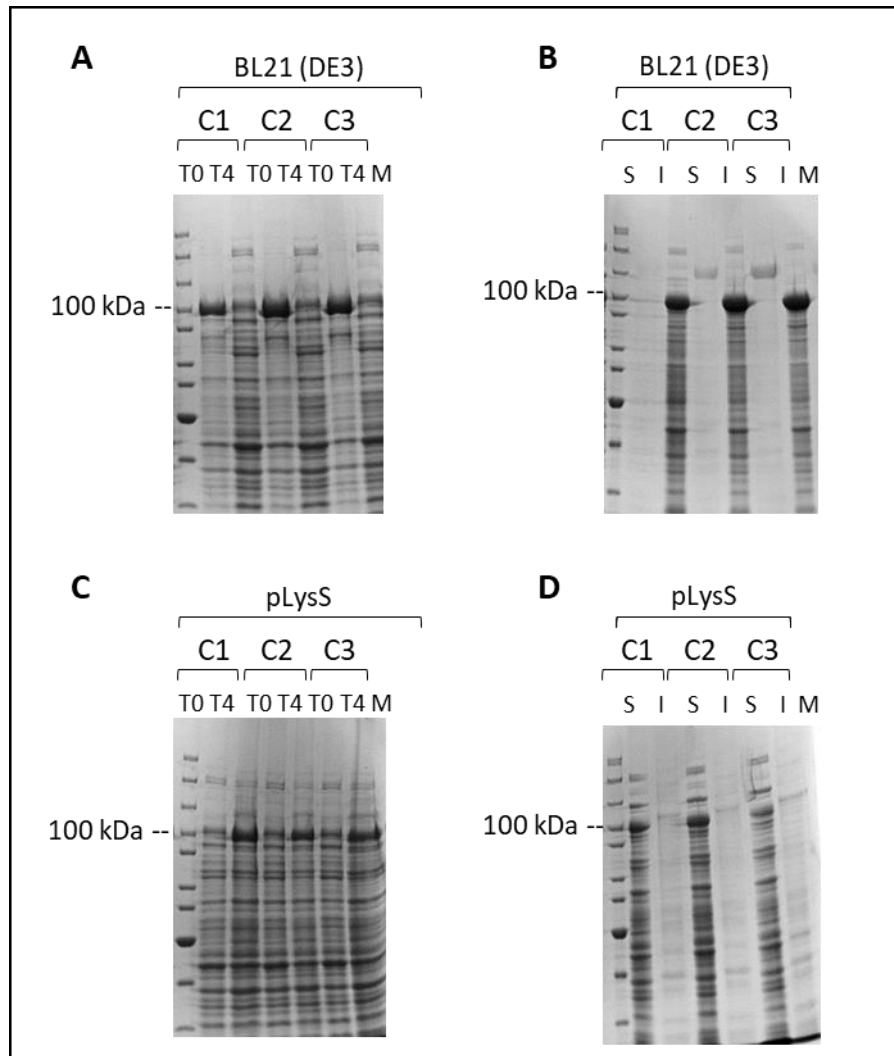


**Figura 16.** Teste de expressão da proteína Sip. Géis de poliacrilamida a 12,5%, corados com *Coomassie blue*, apresentando a expressão da proteína Sip em **A.** *E. coli* Lemo21 (DE3) e **B.** *E. coli* Arctic Express (DE3), onde S de refere à fração solúvel e I à fração insolúvel; C1, C2 e C3 - clones testados e M ao marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*.

#### 4.2.4 Teste de expressão da proteína BibA em *E. coli*

Linhagens de *E. coli* BL21(DE3) e pLysS foram transformadas com o vetor pET28a contendo o gene responsável pela síntese da proteína BibA completa (sem peptídeo sinal e região transmembrana). A expressão da proteína BibA foi alcançada em ambas as cepas testadas, identificada pela presença de uma banda aproximadamente 86 kDa (figura 17A e 17C). Tanto em *E. coli* BL21(DE3) quanto em *E. coli* pLysS, a expressão da proteína BibA se concentrou na fração solúvel (S) (figura 17B e 17D). No entanto, pode-se observar que o nível

de expressão induzido pela cepa DE3 foi mais elevado do que em pLysS. Portanto, a cepa de *E. coli* BL21(DE3) foi escolhida para expressão do antígeno vacinal.

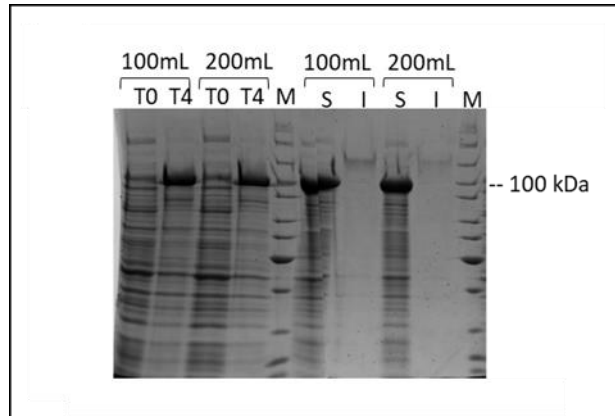


**Figura 17.** Teste de expressão da proteína BibA em *E. coli* BL21(DE3) e *E. coli* pLysS. **A e C.** Análise da expressão da proteína BibA pelos clones C1, C2 e C3, pré e pós-indução (T0 e T4, respectivamente). **B e D.** Análise da expressão da proteína pelos clones C1, C2 e C3 nas frações solúvel (S) e insolúvel (I). M - PageRuler Unstained Protein Ladder. Géis de poliacrilamida a 10%, corados com Coomassie blue,

#### 4.2.5 Produção da proteína BibA em *E. coli*

Com o objetivo de verificar se a expressão da proteína BibA se mantém na fração solúvel com o aumento do volume de indução, foram testadas induções em meio LB em volumes de 100 e 200 mL de cultura. Em ambos os casos não houve variação na concentração de IPTG utilizada na indução ou alterações no tempo, temperatura e agitação. De acordo com o resultado apresentado na figura 18, a proteína se manteve estável com o aumento do volume

de indução. Dessa forma, não houve necessidade de se testar outras cepas de expressão em função do resultado satisfatório alcançado.

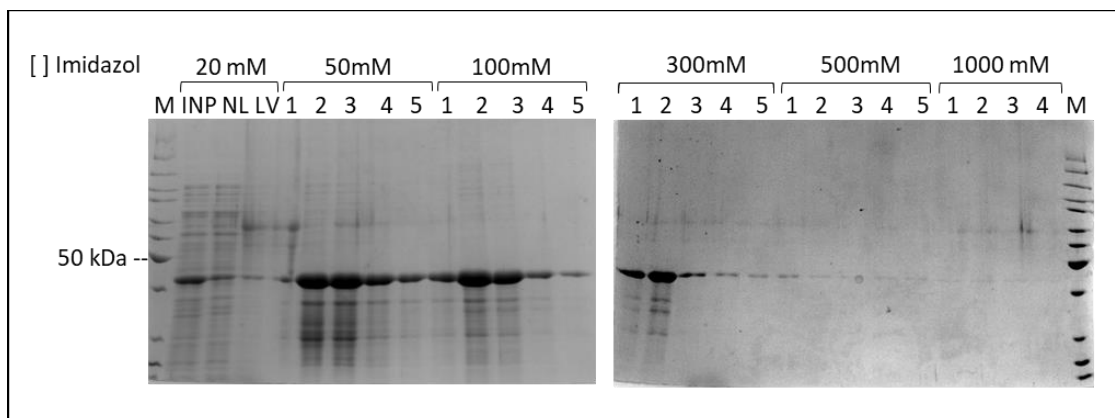


**Figura 18.** Expressão da proteína BibA em *E. coli* BL21(DE3). Gel de poliacrilamida a 10%, corado com *Coomassie blue*, mostrando as amostras de pré-indução (T0) e 4 horas pós-indução (T4) das induções em 100 e 200 mL de meio, com 0,5 mM de IPTG, por 4 horas a 37 °C. Frações solúveis (S) e insolúveis (I) das amostras induzidas estão indicadas na figura. M – marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*.

### 4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

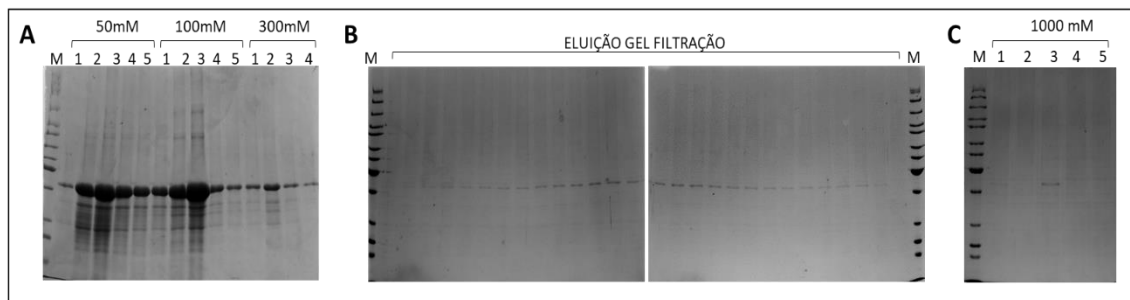
#### 4.3.1 Purificação da proteína Sip

A proteína Sip foi purificada com sucesso a partir da fração solúvel da indução em 200 mL de meio LB. Como pode ser analisado na figura 19, a proteína foi eluída com baixas concentrações de imidazol (de 50 a 300 mM). Também pode ser observada a presença de bandas abaixo da proteína de interesse, sugerindo a ação de alguma protease, mesmo com o uso de tampões autoclavados e de inibidores de proteases.



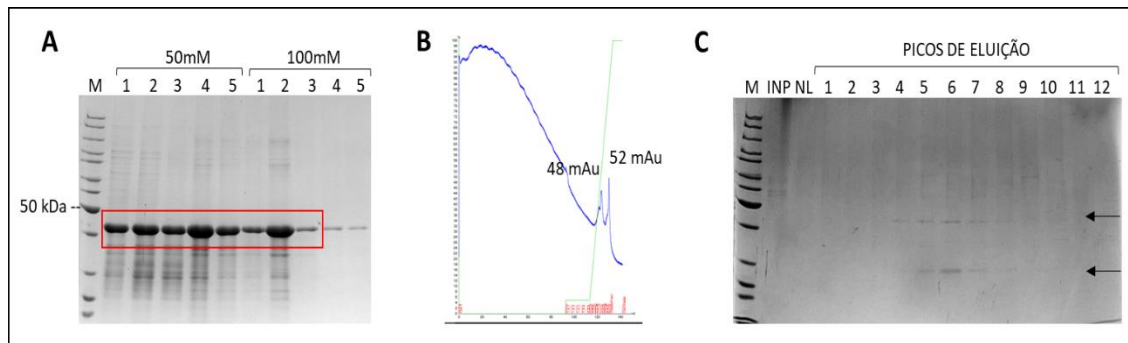
**Figura 19.** Purificação da proteína Sip a partir da fração solúvel de *E. coli* BL21(DE3). M - marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*, INP - extrato solúvel, NL - não-ligado à coluna, LV - lavado, 1 a 5 - frações de eluição com as respectivas concentrações de imidazol.

Com o intuito de minimizar os contaminantes purificados junto com a proteína de interesse, foram testados dois protocolos de cromatografia como segundo passo de purificação. Primeiramente, foi realizada uma cromatografia de exclusão por tamanho. Uma mistura das frações com mais proteína purificada por cromatografia de afinidade ao níquel (figura 20A), totalizando 11,5 mL, foram submetidas à gel filtração. O resultado foi um pico de 9,8 mAu, totalizando 28 mL de amostra, que foram analisadas por meio de SDS-PAGE (figura 20B) e, em seguida, submetidos à concentração em coluna His-Trap HP de 1 mL. Como pode ser verificado na figura 22C, amostra 3, apenas uma alíquota (1 mL) resultou do processo de concentração da proteína BibA, quantidade insuficiente para realização dos processos de avaliação do antígeno vacinal. Tomados em conjunto, esses dados mostram que o processo de purificação não foi eficiente.



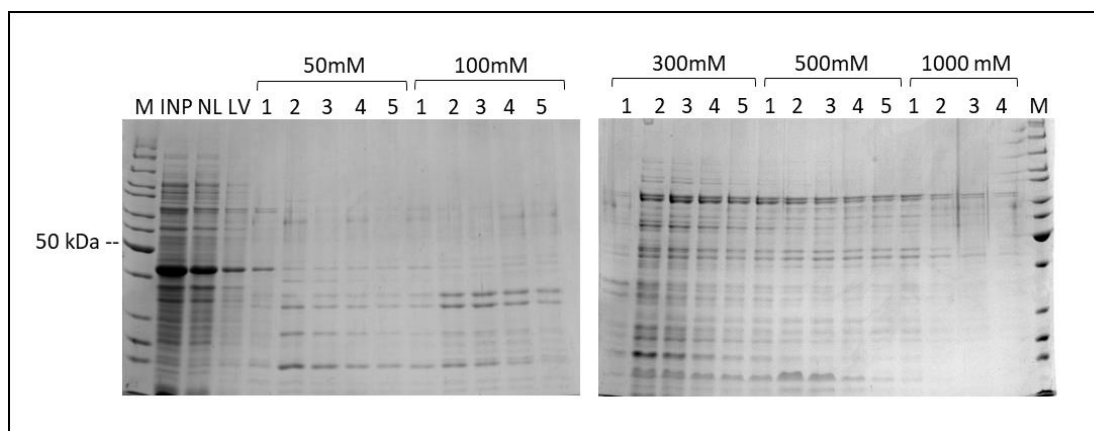
**Figura 20.** Purificação da proteína Sip após cromatografia de gel filtração. **A.** Frações de eluição da cromatografia de afinidade ao níquel. **B.** Frações de eluição obtidas após cromatografia de gel filtração. **C.** Concentração da proteína purificada em coluna HisTrapHP. M - marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*.

A segunda tentativa de purificação da proteína Sip foi baseada em cromatografia de troca iônica. Cerca de 8 mL de proteína Sip purificada por cromatografia de afinidade ao níquel, eluída com 50 e 100 mM de imidazol (demarcadas na figura 21A), foram diluídas para uma concentração final de sal de 50 mM. Essa amostra foi então submetida à cromatografia de troca aniônica, por eluição com gradiente de sal, que resultou em dois picos distintos (figura 21B). Ao analisar as frações obtidas após eluição, verificou-se uma pequena quantidade da proteína de interesse. Além disso, também é possível observar a presença de um contaminante. Essa abordagem proporcionou um maior grau de pureza da amostra, mas não foi eficiente para a obtenção de grandes quantidades da proteína de interesse, limitando a realização de experimentos posteriores.



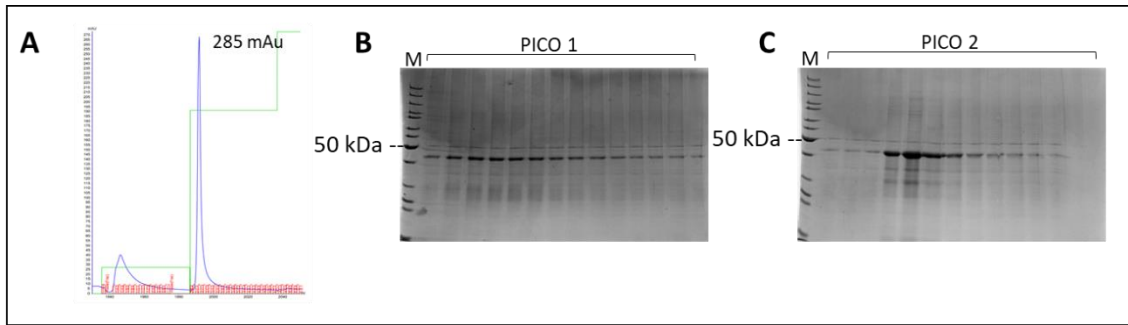
**Figura 21.** Purificação da proteína Sip por cromatografia de troca aniônica. **A.** Frações de eluição da cromatografia de afinidade ao níquel. **B.** Cromatograma resultante da purificação por resina de troca aniônica. **C.** Frações de eluição obtidas após cromatografia de troca aniônica. Géis de poliacrilamida a 12,5% corados com *Coomassie blue*. M - marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*, INP – pool das amostras obtidas por cromatografia de afinidade ao níquel, NL - não-ligado à resina, 1 a 12 - frações de eluição. As setas indicam as bandas referentes à proteína Sip e ao contaminante.

A purificação por troca aniônica também foi testada como primeiro passo cromatográfico, no entanto, o resultado não foi positivo. Grande parte da amostra não se ligou à coluna e muitos contaminantes foram co-purificados, como pode ser verificado na figura 22.



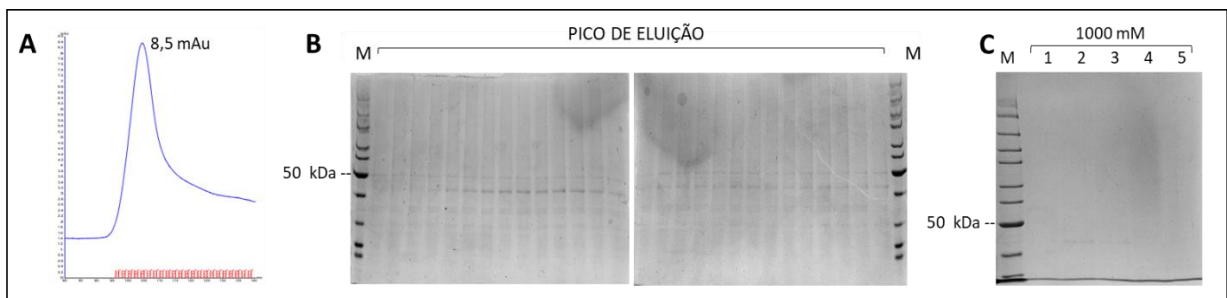
**Figura 22.** Purificação por cromatografia de troca aniônica da proteína Sip. M - marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*, INP - extrato solúvel, NL - não-ligado à resina, LV - lavado, 1 a 5 - frações de eluição com as respectivas concentrações de sal (NaCl).

A fração insolúvel obtida após indução de Sip em *E. coli* BL21(DE3) foi submetida à solubilização com tampão contendo ureia, seguida de renovelamento por diluição pulsada. A amostra foi purificada por meio de cromatografia de afinidade ao níquel, resultando em 2 picos distintos, sendo o maior de 285 mAu (figura 23A). As frações referentes aos picos de eluição foram analisadas por meio de SDS-PAGE, onde foi possível verificar a presença da proteína Sip (figura 23B e 23C).



**Figura 23.** Purificação da proteína Sip obtida após reenovelamento e cromatografia de afinidade ao níquel. **A.** Cromatograma resultante da purificação por resina níquel. **B.** Frações de eluição obtidas após cromatografia. Géis de poliacrilamida a 12,5% corados com *Coomassie blue*. M - marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*.

As frações eluídas no pico 2 da cromatografia de afinidade foram agrupadas. No total, 8 mL de amostra foram submetidos à cromatografia de exclusão por tamanho. O pico obtido no cromatograma foi bastante disperso (figura 24A), resultando em 32 alíquotas com traços da proteína (figura 24B). Todas as 32 frações foram agrupadas e submetidas à cromatografia de afinidade ao níquel para realizar a concentração da proteína Sip, o que não foi bem sucedido. Como pode ser observado na figura 24C, não foi possível visualizar a banda referente à proteína. Esses dados mostram que a combinação desses dois passos cromatográficos para purificação da proteína Sip renovelada não foi eficiente.

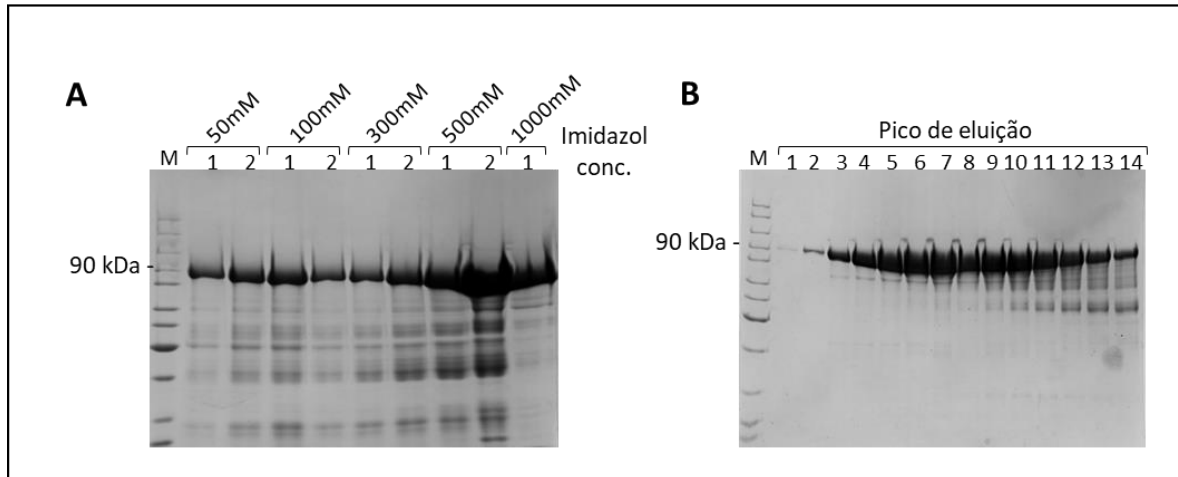


**Figura 24.** Purificação da proteína Sip obtida a partir da fração insolúvel por cromatografia de gel filtração. **A.** Cromatograma referente à purificação da proteína Sip por cromatografia de exclusão por tamanho em coluna Sephacryl S-200, apresentando o pico de eluição da proteína. **B.** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com *Coomassie blue* referente às amostras obtidas a partir dos picos de eluição. **C.** Eluição da proteína Sip após concentração em coluna HisTrap HP 1 mL. M- marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*

#### 4.3.2 Purificação da proteína BibA

A proteína BibA, induzida em 3 L de cultura, pode ser purificada com sucesso por meio do uso de cromatografia de afinidade ao níquel (figura 25A), identificada pela presença de uma banda de 86 kDa em gel de poliacrilamida. A proteína BibA também foi eluída da coluna de níquel a partir do uso de 50 mM de imidazol, com pico em 1 M. Como o grau de pureza da proteína não foi satisfatório, fez-se necessário utilizar um passo adicional de

purificação, a cromatografia de exclusão por tamanho. Como pode ser verificado na figura 25B, a proteína BibA foi eluída com alto grau de pureza. As frações de 3 a 9 foram coletadas, resultando um rendimento final de 4 g/L.

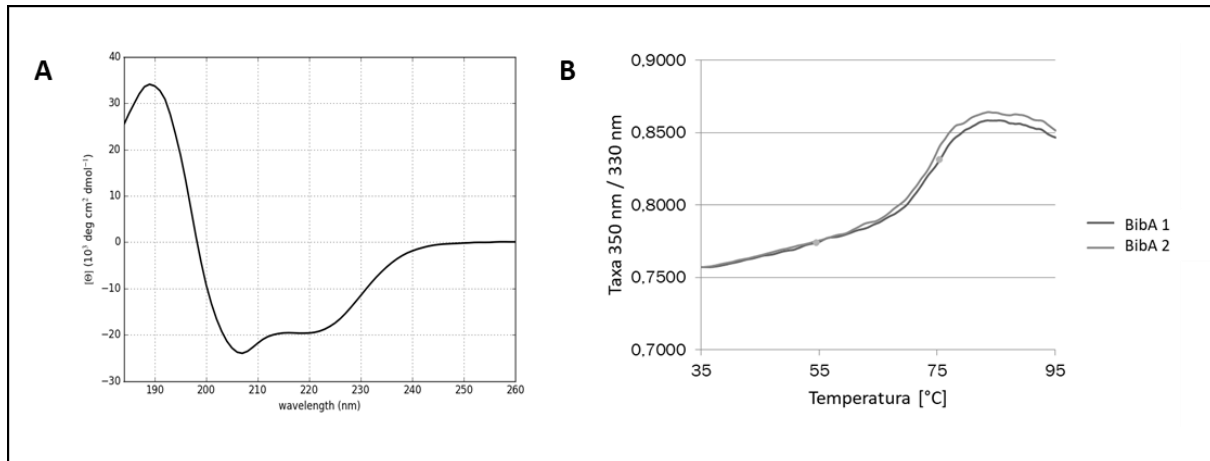


**Figura 25.** Purificação da proteína BibA (86 kDa), obtida a partir da fração solúvel em *E. coli* BL21(DE3). **A.** Avaliação da cromatografia de afinidade ao níquel, mostrando as frações eluídas com gradiente crescente de imidazol. 1 e 2 – frações eluídas com a mesma concentração de imidazol. **B.** Cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), usando a coluna HiPrep™ 26/60 Sephacryl S-200. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com *Coomassie blue*. M - marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEINA BibA

Uma vez purificado, o antígeno BibA foi analisado por espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD). O perfil de CD gerado com a proteína recombinante mostrou um mínimo local em 207,7 nm e um máximo local em 189,8 nm (Figura 26A). Os resultados gerados após a análise utilizando K2D3 indicaram um conteúdo de alfa-hélice de 64% e confirmaram que a proteína recombinante produzida em *E. coli* permanece enovelada. Além disso, a proteína recombinante também foi avaliada quanto ao seu perfil de desenovelamento devido à variação térmica utilizando Tycho (Nanotemper) (Figura 26B). Os dados demonstram que o antígeno BibA possui uma temperatura média de inflexão de 74,4°C, confirmando que o antígeno apresenta alta estabilidade térmica e que permanece enovelado após estocagem a -80°C. Os mesmos ensaios não foram conduzidos com o antígeno Sip devido à impossibilidade de obtenção do antígeno com alto grau de pureza.





**Figura 26.** Caracterização da adesina bacteriana imunogênica recombinante BibA. **A.** Espectro de dicroísmo circular do antígeno BibA a 0,2 mg/mL em tampão fosfato 10 mM, correspondente à estrutura secundária da proteína enovelada. O mínimo característico foi indicado em 207,7 nm e o máximo em aproximadamente 189,8 nm, utilizando o espectropolarímetro JASCO J-810 e a análise K2D3, confirmando a presença predominante de conteúdo alfa-hélice. **B.** Termo-estabilidade do antígeno recombinante BibA avaliado por meio de aquecimento de 35 a 95°C em equipamento *Tycho NT.6 system* (Nanotemper). As curvas indicam o ponto de exposição de triptofanos e consequente desenovelamento da proteína recombinante em uma média de 74,4°C.

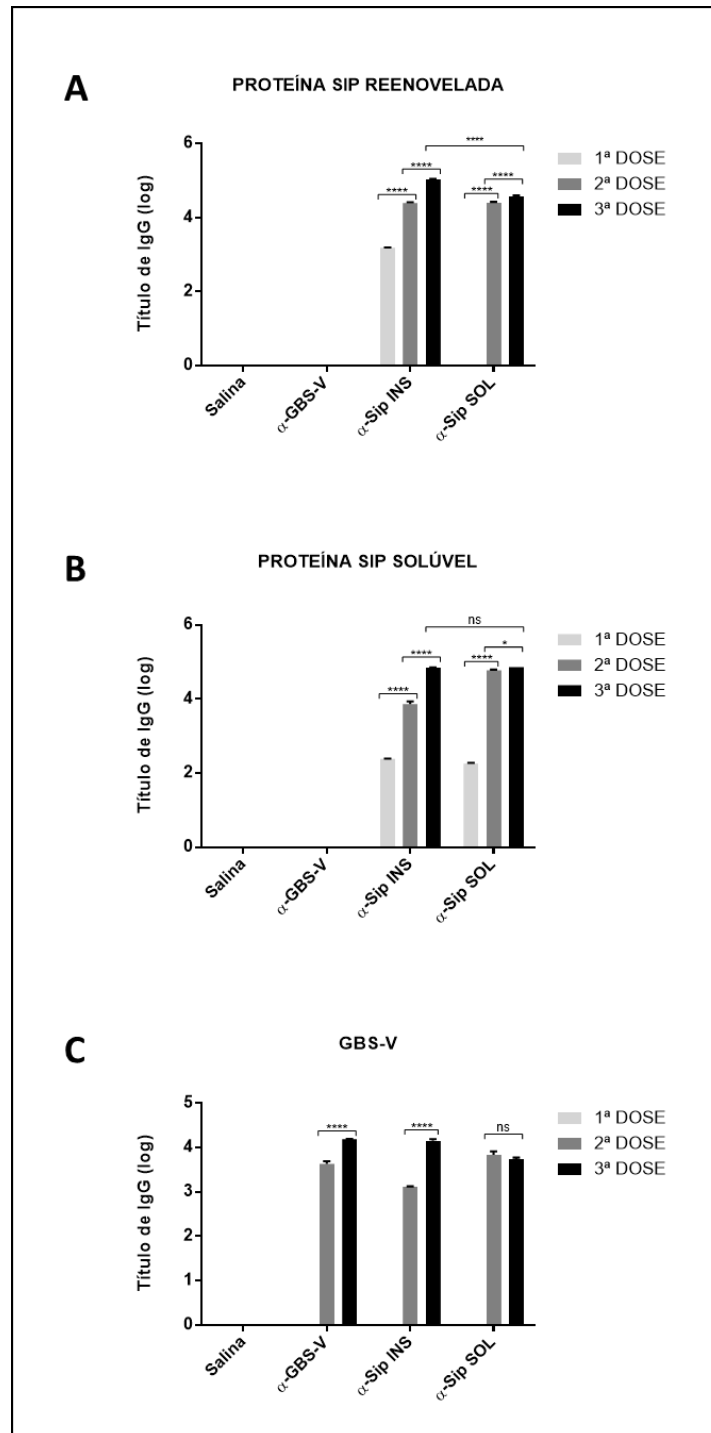
#### 4.5 PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL EM CAMUNDONGOS Balb/c

##### 4.5.1 Soro policlonal anti-Sip

Os títulos de anticorpos obtidos após cada dose de imunização dos camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, com as proteínas recombinantes ou com a bactéria GBS-V (2603 V/R), em associação com o adjuvante LT-1, foram avaliados por meio de ensaio de ELISA. Como pode ser avaliado nas figuras 27A e 27B, as imunizações realizadas por via subcutânea com a proteína Sip obtida a partir de purificação da fração solúvel expressa em *E. coli* BL21(DE3) (SOL) ou com a proteína Sip obtida a partir do processo de reenovelamento (INS), resultaram em anticorpos capazes de reconhecer ambas as proteínas (nativa e reenovelada).

O soro policlonal gerado por meio da imunização com a bactéria GBS-V, na diluição de 1:500, não foi capaz de reconhecer os antígenos recombinantes, reconhecendo apenas o GBS do sorotipo V (figura 27C). No entanto, os soros produzidos contra as proteínas recombinantes foram capazes de reconhecer as células do sorotipo V. Esses dados demonstram que ambas as proteínas são imunogênicas, sendo reconhecidas pelo hospedeiro e induzindo respostas imunes. Além disso, o fato de os soros produzidos contra as proteínas recombinantes serem capazes de reconhecer a bactéria intacta por meio de ensaio de ELISA,

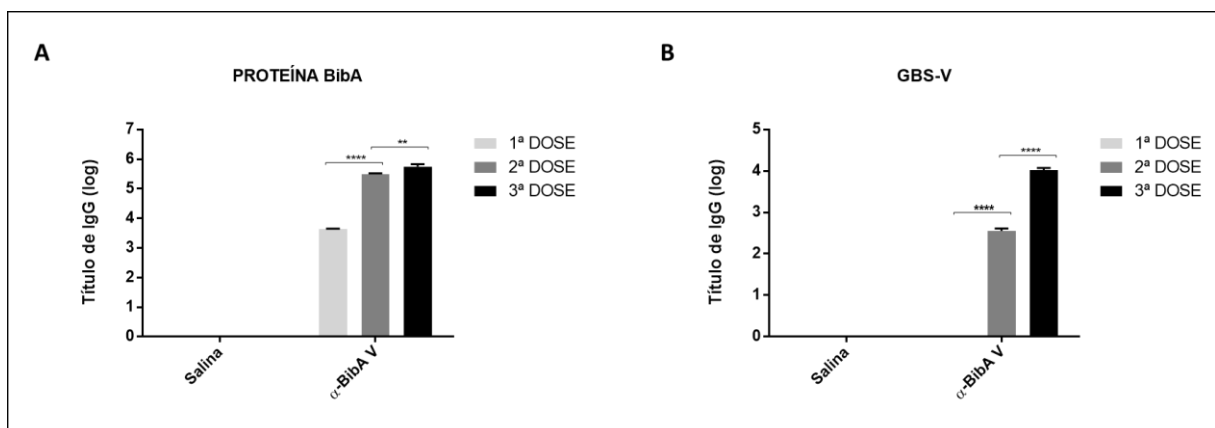
indica que esses soros podem ser utilizados para realização de ensaios para a detecção do patógenos, como imunofluorescência.



**Figura 27.** Avaliação dos títulos de anticorpos IgG gerados a partir das imunizações com as proteínas Sip solúvel ( $\alpha$ -Sip SOL), Sip obtida por reenovelamento ( $\alpha$ -Sip REF) ou contra GBS-V ( $\alpha$ -GBS-V). Os pools dos soros obtidos foram testados contra as proteínas **A.** Sip solúvel, **B.** Sip insolúvel (reenovelada) e **C.** sensibilização com o GBS-V. Os valores dos títulos foram determinados a partir de 2 experimentos independentes ( $n = 5$  animais por grupo) e representam médias  $\pm$  DP. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas usando *two-way* ANOVA com pós-teste Tukey. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \* $p < 0,05$ , ns: valores sem diferença estatisticamente significante.

#### 4.5.2 Soro produzido contra a proteína BibA

Os títulos de anticorpos obtidos após cada dose de imunização dos camundongos fêmeas da linhagem Balb/c com a proteína BibA foram avaliados por meio de ensaio de ELISA, tanto com a proteína BibA recombinante, quanto com as células de GBS-V. Como pode ser avaliado na figura 28, a imunização realizada por via subcutânea com a proteína BibA obtida a partir de purificação da fração solúvel expressa em *E. coli* BL21(DE3), resultou em altos títulos de anticorpos, capazes de reconhecer a proteína recombinante (figura 28A). Além disso, o soro produzido contra a proteína recombinante foi capaz de reconhecer o GBS do sorotipo V (figura 28B). Assim como os resultados obtidos com a proteína Sip recombinante, esses dados demonstram que a proteína BibA é imunogênica e o soro policlonal produzido contra a proteína BibA também pode ser utilizado para realização de ensaios para detecção do GBS e da proteína de interesse.



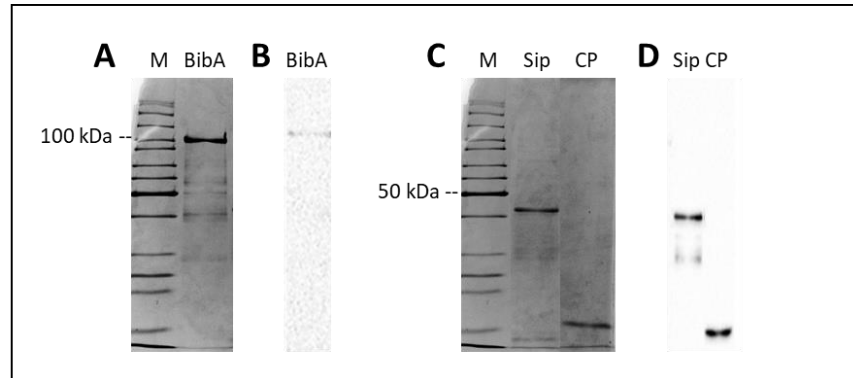
**Figura 28.** Ensaio de ELISA para avaliação dos títulos de anticorpos IgG gerados a partir da imunização com a proteína BibA solúvel. Os *pools* dos soros obtidos foram testados contra a proteína BibA solúvel (A) ou contra o *S. agalactiae* do sorotipo V (B). Os valores dos títulos foram determinados a partir de 2 experimentos independentes (n = 5 animais por grupo) e representam médias ± DP. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas usando *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.6 RECONHECIMENTO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE GBS

##### 4.6.1 Imunodetecção em membranas (*Western blot*)

As proteínas Sip e BibA obtidas após purificação a partir da fração solúvel expressa em *E. coli* BL21(DE3) foram analisadas por meio de SDS-PAGE, seguido de *western blot*. As proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-histidina. Como pode ser verificado na figura 29, ambos os antígenos (Sip

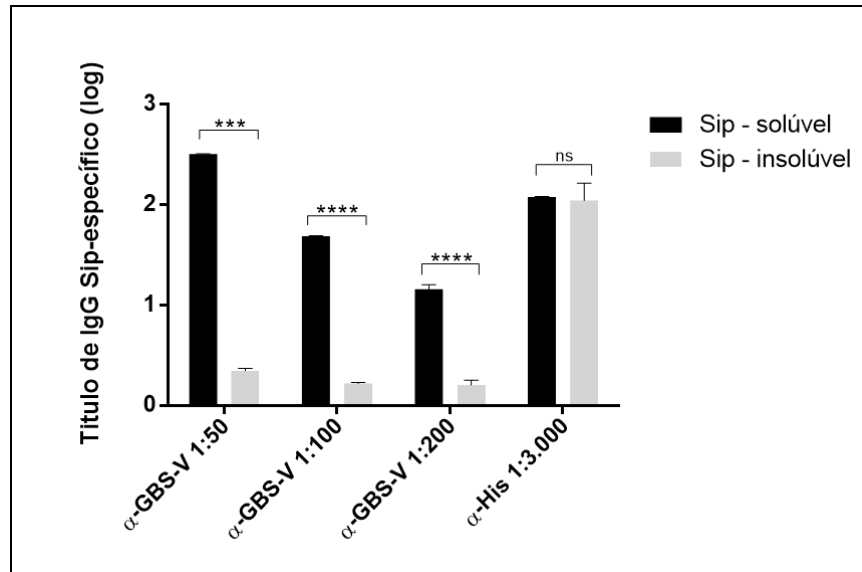
45,2 kDa e BibA 86 kDa) foram reconhecidos pelo anticorpo dirigido contra a cauda de poli-histidina presente na extremidade N-terminal das proteínas recombinantes.



**Figura 29.** Análise das proteínas purificadas por meio de *western blot*. **A e B.** Gel de poliacrilamida a 10%, corado com *Coomassie blue*, e *western blot* da proteína BibA (86 kDa), **C e D.** Gel de poliacrilamida a 12,5%, corado com *Coomassie blue*, e *western blot* da proteína Sip (45,2 kDa). Os resultados de imunodeteção em membrana confirmam a presença da cauda de histidina na extremidade N-terminal de ambas as proteínas recombinantes. M - marcador *PageRuler Unstained Protein Ladder*, CP - controle positivo, proteína  $\Delta$ NS1 de dengue.

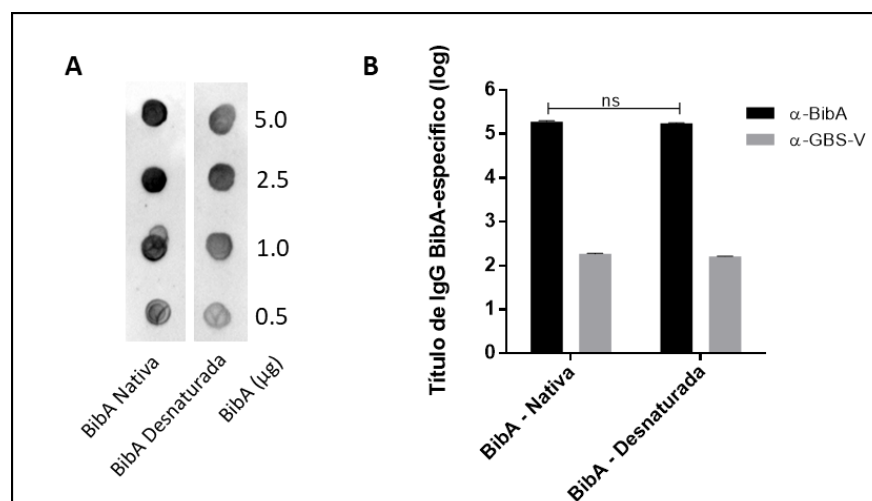
#### 4.6.2 Imunodeteção em placa (ELISA)

Como a proteína Sip pode ser purificada a partir da fração solúvel expressa em *E. coli* BL21(DE3) e a partir da fração insolúvel expressa em *E. coli* Arctic Express, ambas as proteínas foram avaliadas quanto à capacidade de reconhecimento por soro policlonal anti-GBS-V e anti-histidina em ensaio de ELISA. Como pode ser observado na figura 30, o anticorpo anti-histidina foi capaz de reconhecer ambas as proteínas com a mesma intensidade. A proteína proveniente da fração insolúvel, obtida após desnaturação e reenovelamento, não parece apresentar o mesmo perfil de enovelamento que a proteína nativa, sendo reconhecida com menor afinidade pelo soro policlonal anti-GBS-V. Por sua vez, a proteína solúvel foi mais fortemente reconhecida pelo soro policlonal anti-GBS-V, sugerindo que esta proteína apresenta enovelamento similar à proteína nativa.



**Figura 30.** Ensaio de ELISA para avaliação do reconhecimento da proteína Sip. A proteína Sip foi obtida a partir da fração solúvel em *E. coli* BL21(DE3), ou após reenovelamento da fração insolúvel de extrato expresso em *E. coli* Arctic Express pelo anticorpo policlonal anti-GBS-V. Como controle positivo, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-histidina ( $\alpha$ -His). Os valores dos títulos foram determinados a partir de 2 experimentos independentes ( $n = 5$  animais por grupo) e representam médias  $\pm$  DP. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas usando *two-way* ANOVA com pós teste de Tukey, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , ns: valores sem diferença estatisticamente significativa.

O antígeno rBibA, tanto na sua forma nativa, quanto desnaturado pelo calor, foi reconhecido por anticorpos séricos provenientes de camundongos imunizados com células de GBS-V ou com a proteína recombinante BibA (Figura 31). Estes resultados sugerem que os epítomos conformacionais e lineares presentes na proteína BibA de GBS (proteína nativa) também estão presentes na proteína recombinante produzida em *E. coli*.



**Figura 31.** Reatividade de soros policlonais contra o antígeno BibA nativo ou BibA desnaturado por calor. **A.** Dot blot contra diferentes concentrações de proteína BibA nativa ou desnaturada pelo calor (0,5 a 5  $\mu$ g), testada com o soro anti-GBS-V, diluído 1:500. **B.** ELISA sensibilizado com 100 ng de proteína nativa ou desnaturada. Os soros policlonais anti-BibA ou anti-GBS-V foram utilizados como anticorpos primários, na diluição de 1:500.

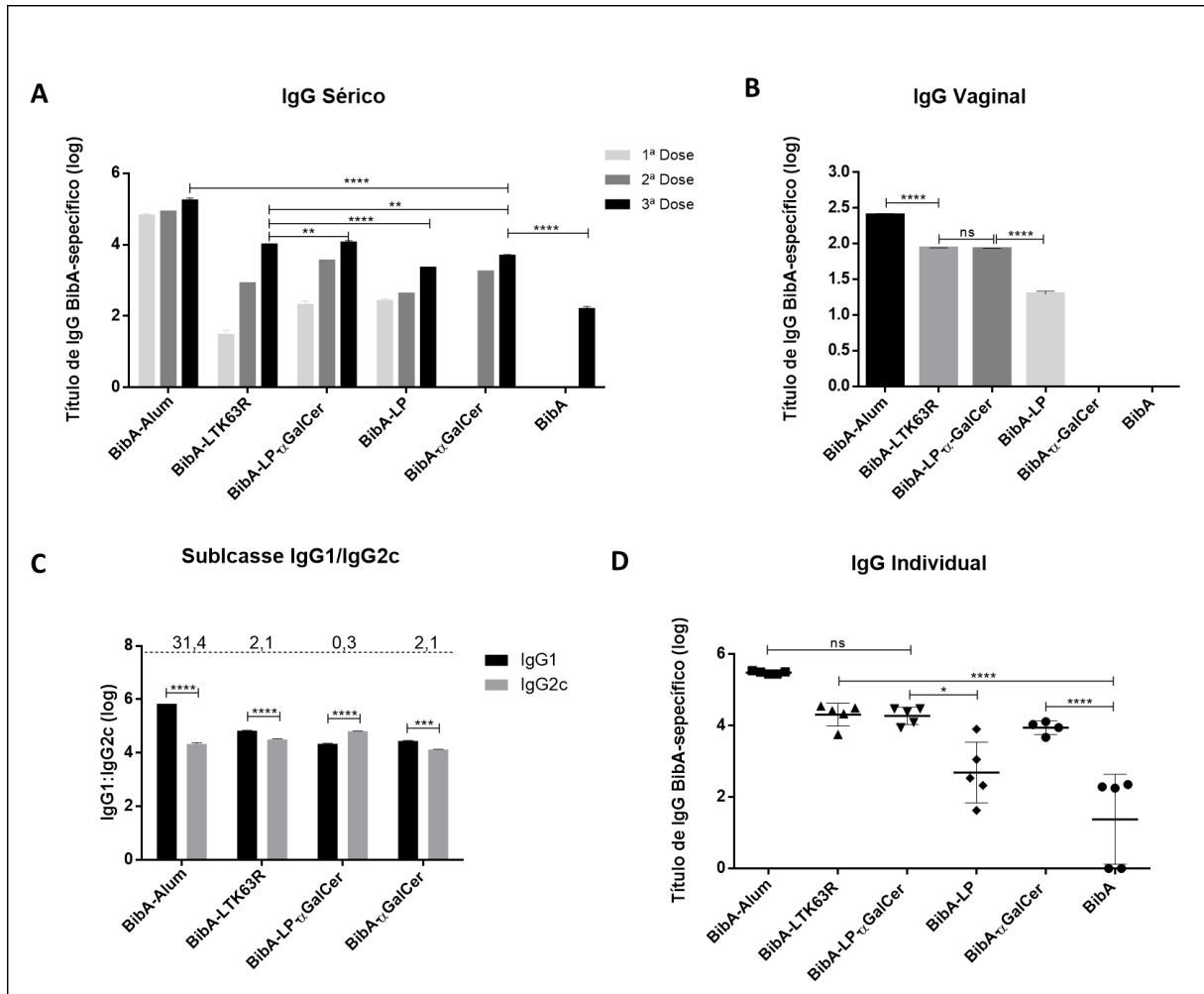
Os valores representam médias  $\pm$  DP de dois experimentos independentes. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas usando *two-way* ANOVA com pós teste de Bonferroni. ns: valores sem diferenças estatisticamente significantes.

## 4.7 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 COM FORMULAÇÕES VACINAIS

### 4.7.1 Avaliação da resposta imune humoral

A fim de testar a imunogenicidade da proteína rBibA, fêmeas da linhagem C57BL/6 foram imunizadas com diferentes formulações contendo o antígeno rBibA purificado, administrado por via parenteral (s.c.) ou mucosa (i.n. ou vaginal), associado a diferentes adjuvantes. Após um regime de imunização de três doses, amostras de soro e de lavado vaginal foram coletadas para medir a presença de IgG antígeno-específico. Aumentos significativos nos níveis de anticorpos IgG BibA-específicos foram detectados em soros coletados de camundongos imunizados com rBibA, com títulos mais elevados em camundongos imunizados por via parenteral, seguido por camundongos imunizados por via i.n. com rBibA associada à LTK63R e rBibA associada à lipossoma e  $\alpha$ -GalCer (figura 32A). A imunização por via vaginal não resultou na indução de anticorpos IgG BibA-específicos.

Também foi possível detectar IgG BibA-específico nos lavados vaginais de camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais associadas à adjuvantes, com exceção de BibA associada a  $\alpha$ -GalCer ou BibA sem adjuvante (figura 32B). A análise das respostas de subclasses de IgG sérico indicou que a razão IgG1/IgG2c antígeno-específica é significativamente maior em camundongos imunizados por via s.c. do que em camundongos imunizados via i.n. (figura 32C). Imunizações com BibA-LTK63R ou BibA- $\alpha$ -GalCer resultaram em um perfil misto de resposta Th1/Th2, com tendência para um padrão de resposta do tipo Th2, contrário dos resultados obtidos a partir da administração de BibA-LP- $\alpha$ -GalCer (figura 32C). Os títulos individuais séricos de IgG BibA-específicos quantificados após ao final do protocolo vacinal mostraram uma maior variabilidade entre camundongos imunizados por via i.n. quando comparados com animais imunizados por via s.c. Apenas dois grupos apresentaram níveis de anticorpos estatisticamente inferiores se comparados com os demais grupos, estes foram imunizados com BibA-LP ou BibA não adjuvantada (figura 32D).

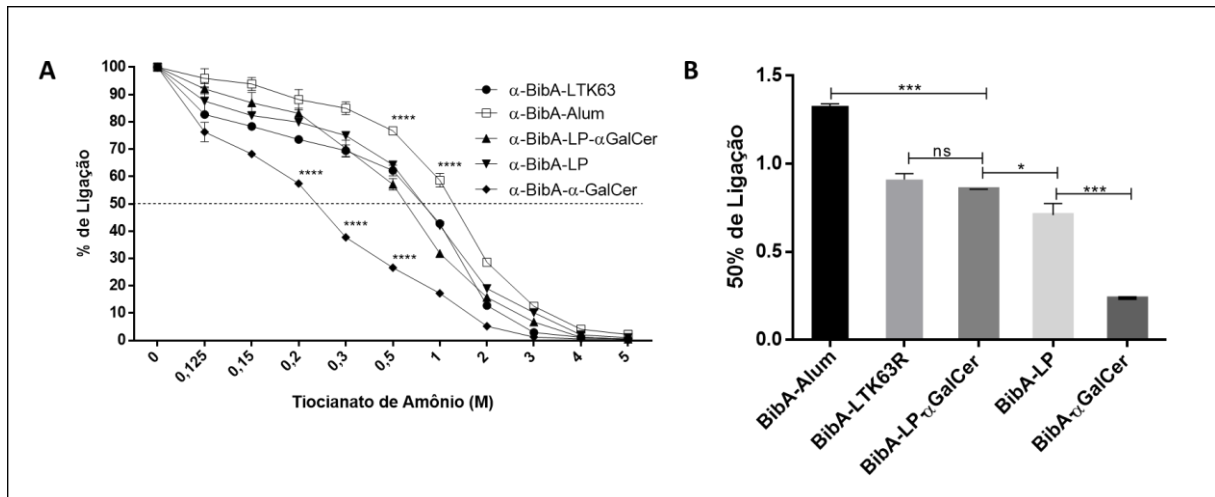


**Figura 32.** Caracterização da resposta de anticorpos gerada após imunização com a proteína rBibA. **A.** Fêmeas da linhagem C57BL/6 foram imunizadas com três doses de rBibA (20  $\mu$ g) sozinha ou BibA co-administrada com um dos adjuvantes testados: LTK63R, LP- $\alpha$ -GalCer, LP ou  $\alpha$ -GalCer, por via i.n., ou Alum por via s.c. Análises das respostas de IgG antígeno-específicas foram realizadas em *pool* de amostras coletadas 2 semanas após a administração de casa dose da imunização. **B.** Análise da resposta de IgG antígeno-específica realizada com o *pool* de amostras de lavado vaginal coletadas 2 semanas após a terceira dose de imunização. **C.** Avaliação da resposta da subclasse de IgG BibA-específica 2 semanas após a terceira dose de imunização. **D.** Títulos individuais de IgG sérico BibA-específicos induzidos após a terceira dose de imunização. Os títulos de anticorpos anti-BibA foram determinados em dois experimentos independentes ( $n = 5$  animais por grupo). Os valores representam médias  $\pm$  DP, ou medianas (**D**) dos títulos de IgG. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ , utilizando *two-way* ANOVA com pós teste de Tukey. ns: valores sem diferenças estatisticamente significantes.

#### 4.7.2 Avidéz dos anticorpos gerados

A avidéz dos anticorpos gerados a partir da imunização com diferentes formulações vacinais contendo a proteína BibA foi testada por meio de dissociação dos anticorpos com tiocianato de amônio. Detectou-se maior afinidade ao antígeno em soros obtidos de camundongos imunizados com BibA-Alum (figura 33A). A quantidade de tiocianato de amônio necessária para dissociar a ligação de 50% dos anticorpos policlonais gerados nos diferentes grupos de imunização foi de 1,3 M em camundongos imunizados com BibA-Alum,

0,9 M para BibA-LTK63R, 0,85 M para BibA-LP- $\alpha$ GalCer, 0,7 para LP e 0,2 M para animais imunizados com BibA- $\alpha$ GalCer (figura 33B). A imunização apenas com BibA não induziu anticorpos suficientes para serem testados na avaliação da resposta da subclasse e nos ensaios de afinidade por antígeno.

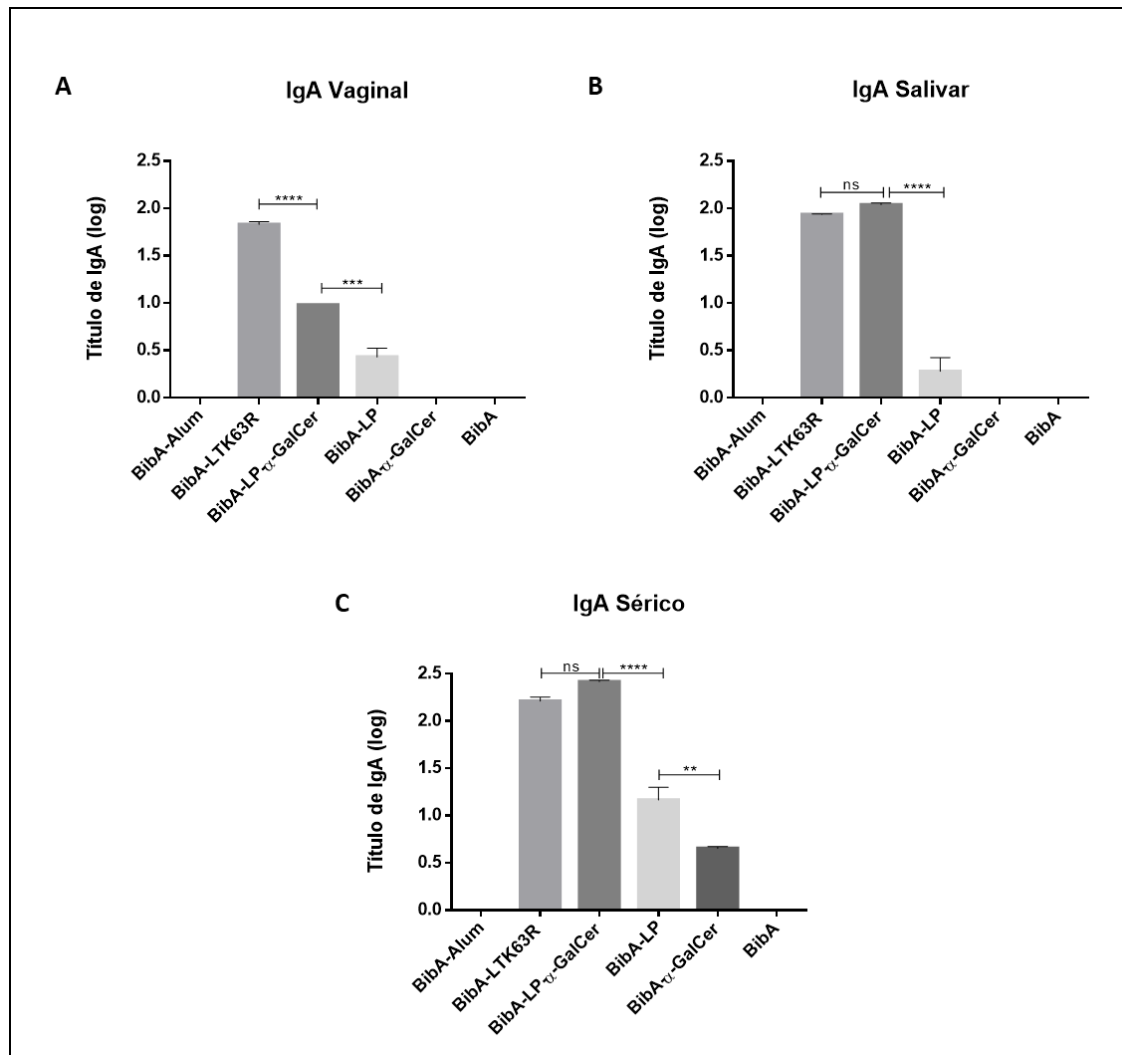


**Figura 33.** Afinação de anticorpos anti-BibA com o antígeno BibA purificado. **A.** Os valores são expressos como porcentagem de anticorpos que permaneceram ligados ao antígeno adsorvido na fase sólida após incubação com tiocianato de amônio em relação à reação realizada sem tiocianato de amônio. **B.** Concentração (em M) de tiocianato de amônio necessária para dissociar 50% do anticorpo ligado ao antígeno. Os títulos de anticorpos anti-BibA foram determinados em dois experimentos independentes ( $n=5$  animais por grupo). Os valores representam médias  $\pm$  DP dos títulos de IgG. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \* $p < 0,05$ , utilizando *two-way* ANOVA (**A**) ou *one-way* ANOVA (**B**), com pós teste de Tukey. ns: valores sem diferenças estatisticamente significantes.

#### 4.7.3 Produção de IgA

As respostas de IgA secretada também foram avaliadas nos diferentes grupos de imunização. Camundongos imunizados com rBibA foram desafiados por via vaginal com células de GBS sorotipo V. Cinco dias depois, foram coletadas amostras de lavados vaginais, saliva, fezes e soro para determinação das respostas de IgA secretada BibA-específica. Respostas de IgA específicas para BibA foram detectadas nas amostras de saliva e lavado vaginal apenas de camundongos imunizados com BibA-LTK63R, BibA-LP- $\alpha$ GalCer e BibA-LP (figura 34A e 34B). IgA sérico só não pode ser detectado em animais imunizado com BibA-Alum e BibA- $\alpha$ GalCer (figura 34C). Nenhum dos grupos foi capaz de induzir IgA detectável em amostras de fezes (dados não mostrados).



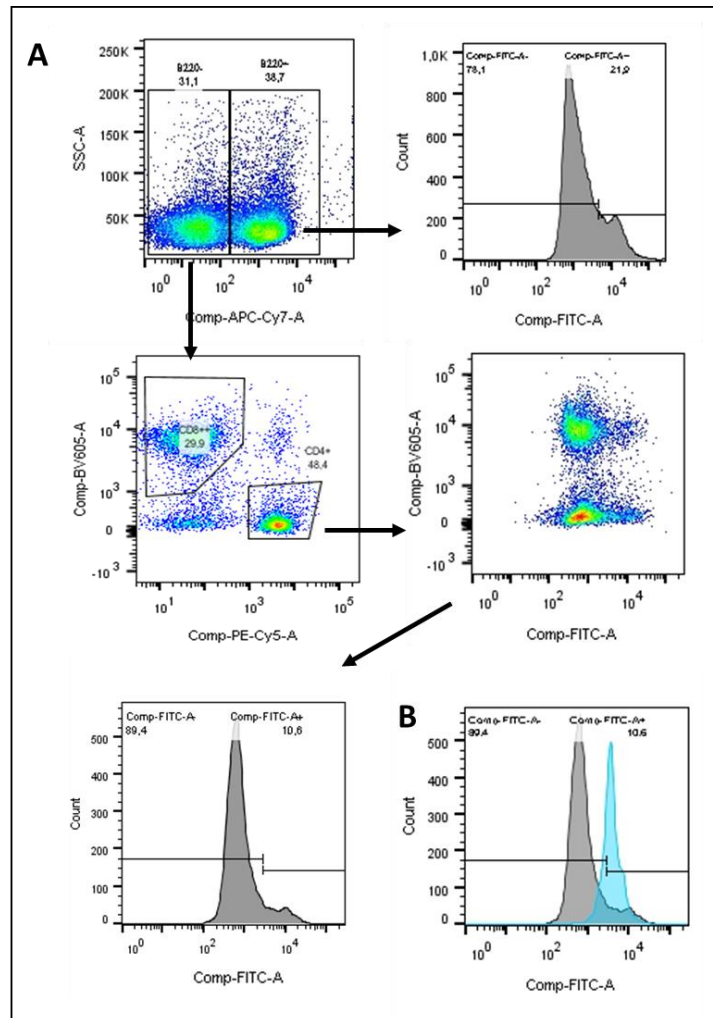


**Figura 34.** Respostas de IgA BibA-específicas. As respostas de IgA secretadas foram medidas em lavados vaginais, saliva e soro coletadas cinco dias após infecção vaginal com GBS-V em camundongos imunizados com as diferentes formulações vacinais. **A.** Respostas de IgA BibA-específicas nos lavados vaginais, **B.** respostas de IgA BibA-específicas na saliva e **C.** respostas de IgA BibA-específicas em amostras de soro. Pool de amostras foram analisados por meio de ensaio de ELISA sensibilizado com 200 ng de proteína rBibA. Os títulos de anticorpos anti-BibA foram determinados em dois experimentos independentes ( $n = 5$  animais por grupo). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  representam diferenças significativas entre os grupos usando *one-way* ANOVA com pós teste de Tukey. ns: valores sem diferenças estatisticamente significante.

#### 4.8 RESPOSTA CELULAR

Os ensaios de citometria realizados para avaliação do perfil polifuncional de citocinas produzidas pelas células imunes induzidas em resposta às diferentes formulações vacinais não funcionaram. Após marcação, verificou-se que a maior parte das células estava morta. Na segunda tentativa, nem mesmo as células controle estimuladas de forma inespecífica foram capazes de produzir citocinas. Dessa forma, avaliou-se apenas a proliferação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup> e células B. A proliferação de linfócitos foi avaliada de acordo com a

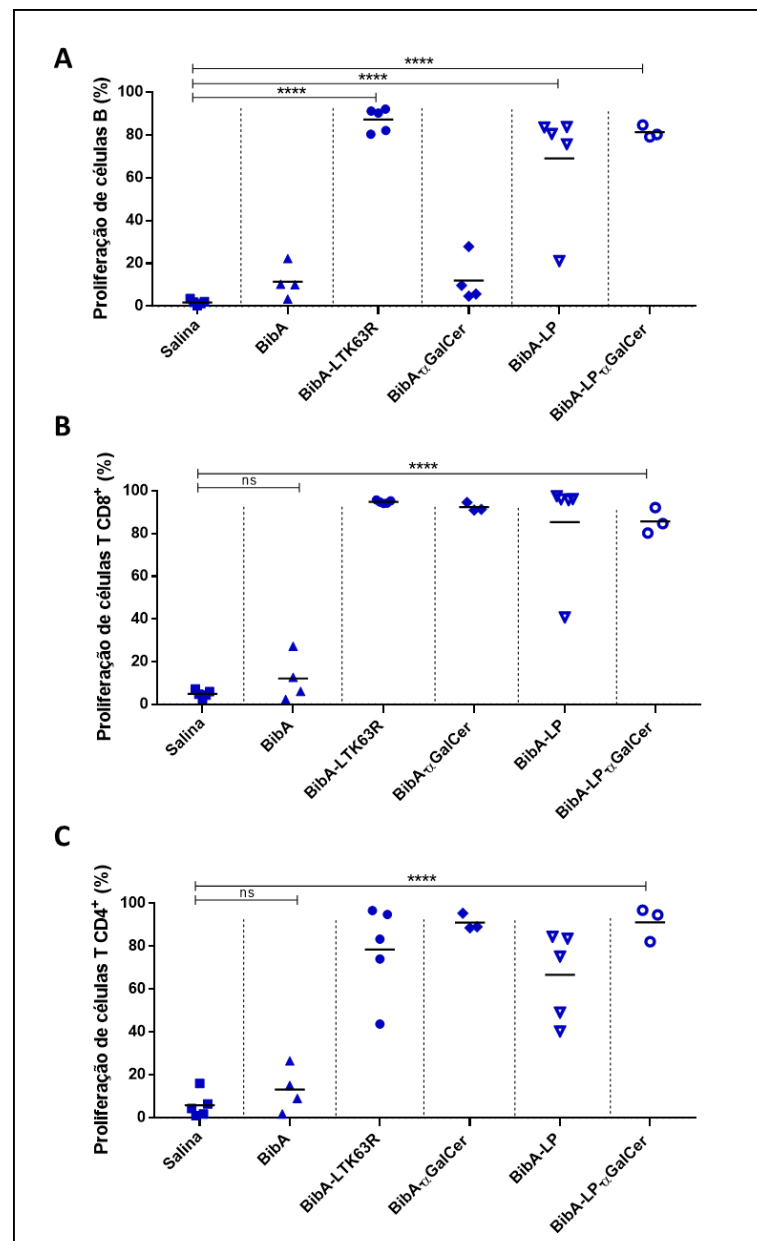
diminuição do sinal de CFSE no canal FITC-A. A estratégia utilizada para avaliação das populações celulares pode ser visualizada na figura 35A. A comparação entre um animal do grupo controle imunizado com salina e um animal imunizado com BibA-LTK63R demonstra o perfil de proliferação determinado a partir da diminuição da intensidade do sinal em FITC (figura 35B).



**Figura 35.** Esquema de análise do perfil de proliferação de linfócitos B, T CD4 e T CD8. **A.** Estratégia utilizada para separação de células B ( $B220^+$ ) e porcentagem de células marcadas com CFSE; células  $B220^-$  foram separadas de acordo com a marcação T CD4 $^+$  ou T CD8 $^+$ . **B.** Sobreposição dos histogramas de células T CD4 $^+$  resultantes da análise de marcação com CFSE de um animal imunizado com BibA-LTK63R (cinza) e um animal controle, tratado com salina (azul), ambos estimulados com rBibA. Dados analisados com o auxílio do software FlowJo v10.

Os grupos imunizados foram avaliados de acordo com a porcentagem de proliferação de linfócitos na presença ou ausência de estímulo específico ( $5 \mu\text{g}$  da proteína rBibA). Não houve diferença na porcentagem de proliferação dentro dos grupos, resultado da proliferação de linfócitos mesmo na ausência do estímulo específico. A proliferação de células B foi significativamente menor no grupo controle salina, BibA não adjuvantada e no grupo tratado

com a formulação vacinal BibA- $\alpha$ GalCer (figura 36A). No entanto, o grupo imunizado com BibA- $\alpha$ GalCer resultou na proliferação de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (figuras 36B e 36C). Esses dados mostram que a ativação da proliferação das células pode ter sido resultado do desafio prévio dos animais com GBS-V, associado à eficácia da formulação vacinal administrada, mas não pelo estímulo *in vitro* com rBibA.

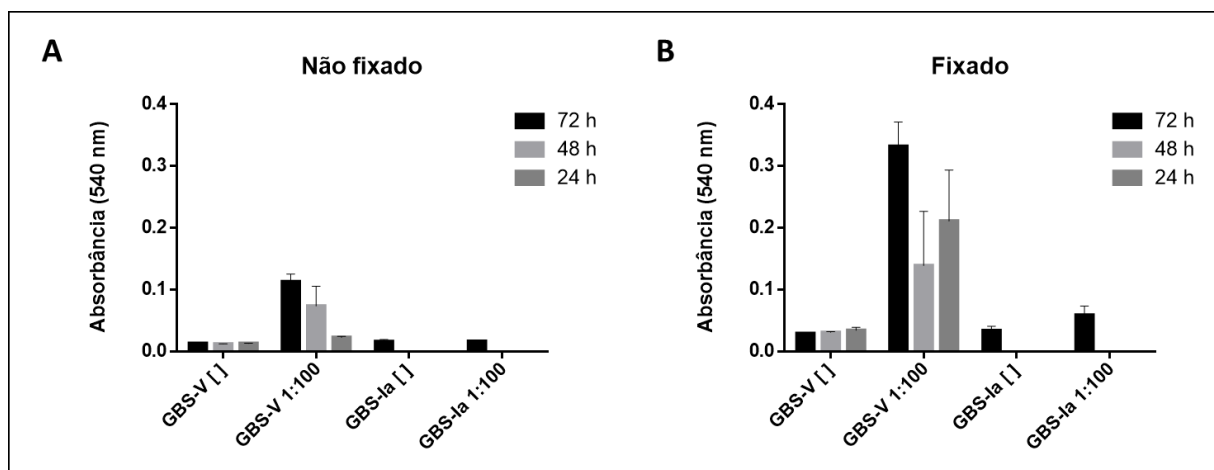


**Figura 36.** Ensaio de linfoproliferação. Porcentagem de proliferação de **A.** linfócitos B, **B.** linfócitos T CD8<sup>+</sup> e **C.** linfócitos T CD4<sup>+</sup>, na presença de estímulo com 5  $\mu$ g de rBibA durante 5 dias. A proliferação foi detectada por meio da diminuição do sinal de CFSE utilizado para marcação das células antes de incubação com o estímulo específico. As porcentagens de linfoproliferação são provenientes de um experimento representativo (n = 3 a 5 animais por grupo). Os resultados representam a mediana dos valores dos respectivos grupos. Diferenças estatísticas foram determinadas em comparação com o grupo salina, usando a análise estatística *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett. \*\*\*\* p < 0,0001, ns: valores sem diferenças estatisticamente significante.

## 4.9 ENSAIOS *in vitro* COM GBS

### 4.9.1 Biofilme

Buscou-se a padronização do ensaio de formação do biofilme utilizando diferentes meios de cultura, bem como diferentes tempos de incubação. No primeiro grupo de ensaios realizados, utilizando meio BM (LOO; CORLISS; GANESHKUMAR, 2000), verificou-se a fraca formação de biofilme pelas duas cepas de GBS (Ia e V) (figura 37). Mesmo com a tentativa de fixação do biofilme com paraformaldeído (figura 37B), o resultado não foi eficiente, atingindo no máximo 0,3 de absorbância a 540 nanômetros (nm) com 72 horas de incubação a 37°C. Observa-se ainda um grande desvio entre as triplicatas, resultado decorrente da fácil remoção do biofilme formado a cada etapa de lavagem.

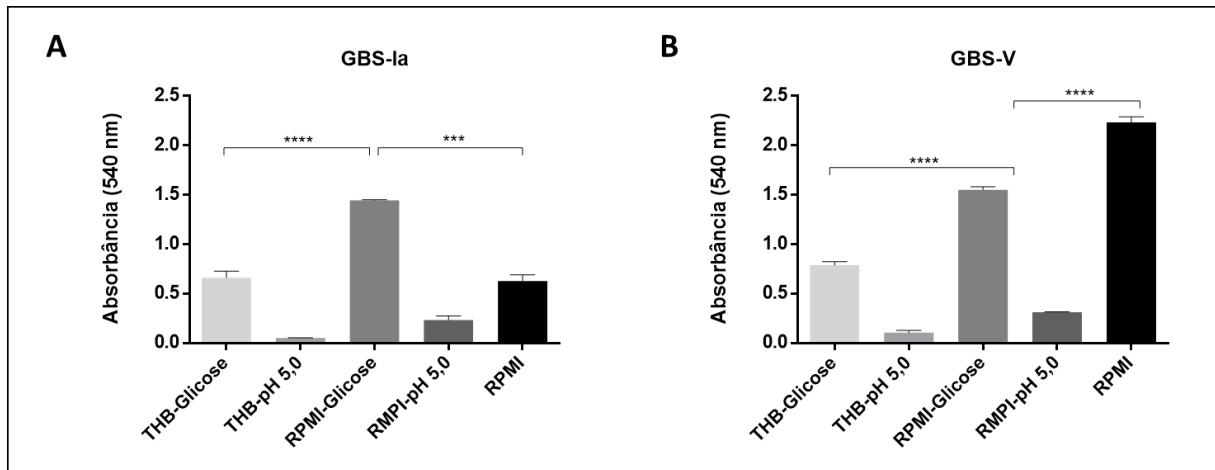


**Figura 37.** Ensaio de biofilme em microplaca utilizando GBS do sorotipo Ia e sorotipo V. **A.** Biofilme não fixado e **B.** biofilme fixado com paraformaldeído. Todos os ensaios foram incubados por 24, 48 e 72 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Os dados representam dois experimentos realizados de forma independente em triplicatas. Os resultados representam a média  $\pm$  DP.

Os testes realizados com os meios THB e RPMI se mostraram mais eficientes para a obtenção de um biofilme mais robusto de GBS. As cepas dos sorotipos Ia e V foram capazes de formar biofilme em meio RPMI adicionado de 1% de glicose (figura 38). A maior diferença obtida entre as cepas foi em relação ao biofilme formado em meio RPMI pH 7,2, onde o GBS do sorotipo V formou um biofilme com absorbância de 2,2 a 540 nm.

No entanto, mesmo após as várias tentativas de padronização de um protocolo para avaliação da formação de biofilme por GBS, as tentativas de testes de inibição da formação de biofilme, realizadas na presença de soro policlonal e seguindo as mesmas condições do protocolo utilizando meio RPMI não foram satisfatórias, não sendo verificada a formação de

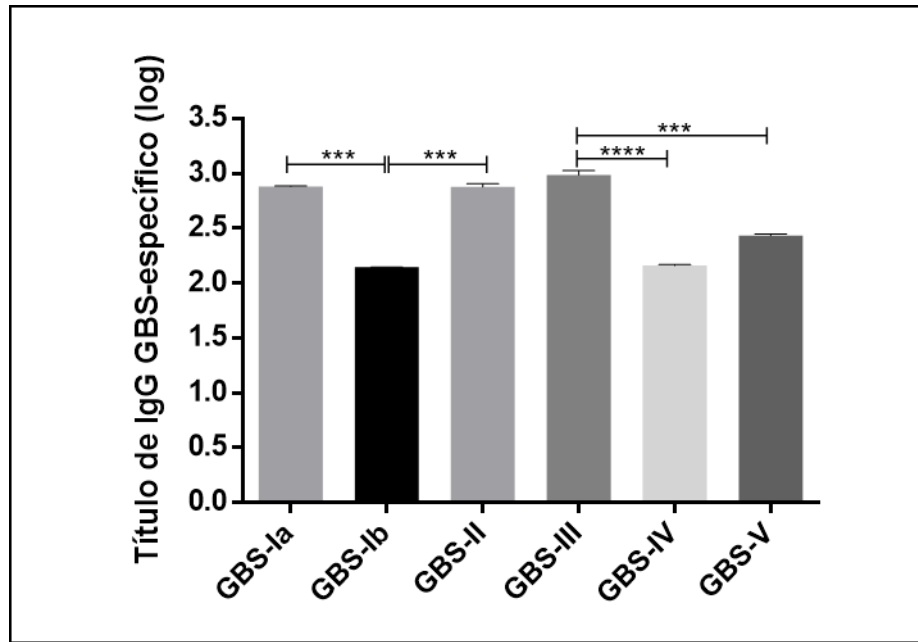
um biofilme estável nos grupos controle. Portanto, outros ensaios *in vitro* mais relevantes foram padronizados.



**Figura 38.** Ensaio de biofilme em microplaca utilizando GBS do sorotipo Ia e sorotipo V. **A.** Biofilme de GBS sorotipo Ia em meio THB e RPMI. **B.** Biofilme de GBS sorotipo V em meio THB e RPMI. Todos os biofilmes foram incubados por 72 horas em estufa de CO<sub>2</sub>. Os dados representam dois experimentos realizados de forma independente, em duplicatas. Análise estatística *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, média ± DP. \*\*\*\* p < 0,0001, \*\*\* p < 0,001.

#### 4.9.2 Reconhecimento de cepas de GBS

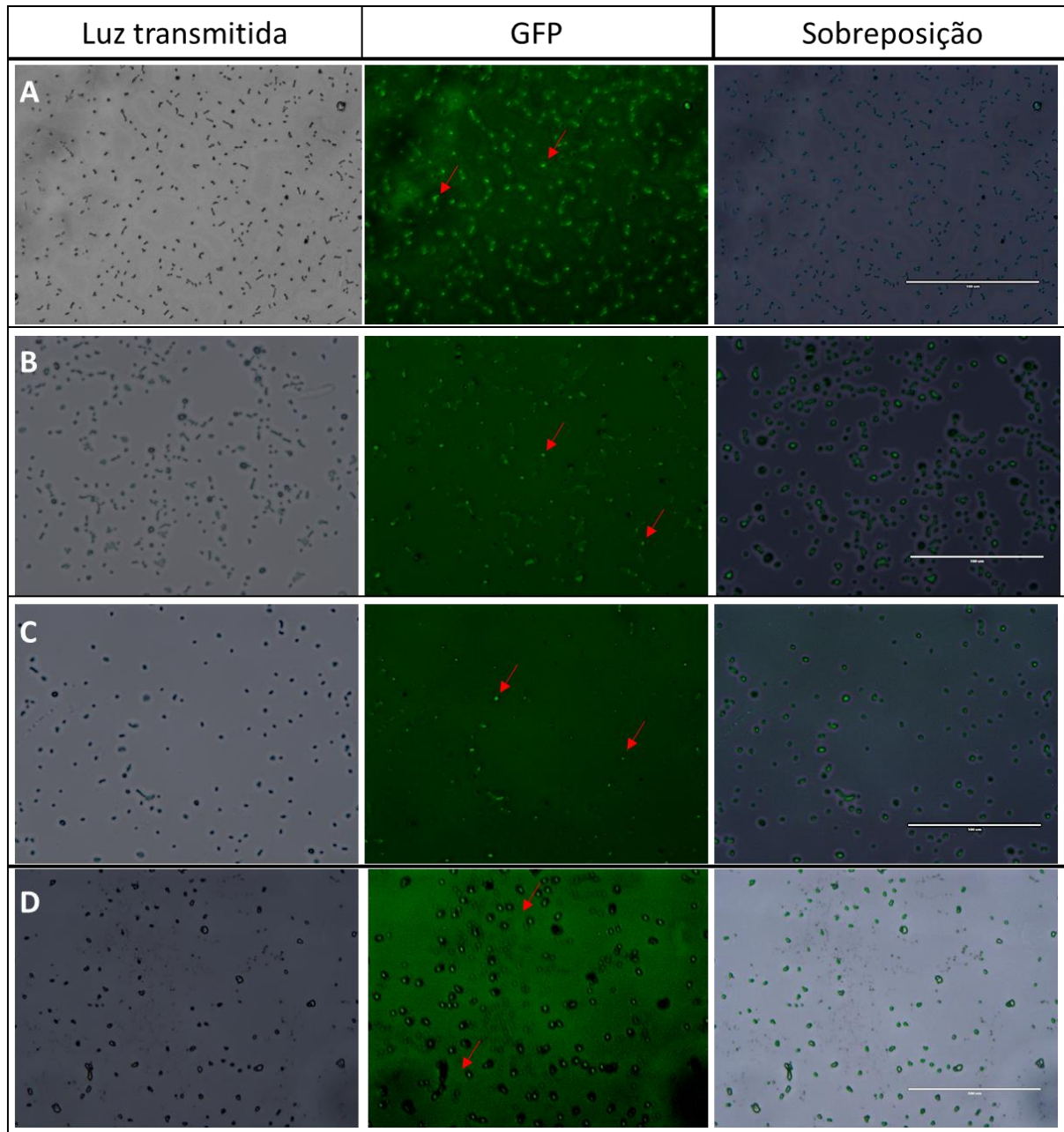
O soro policlonal produzido contra a formulação vacinal BibA-Alum foi testado quanto à capacidade de reconhecer diferentes sorotipos de GBS em ensaio ELISA sensibilizado com a bactéria intacta. Todos os sorotipos testados (Ia, Ib, II, III, IV e V) foram reconhecidos pelo *pool* de soros dos camundongos imunizados com a proteína rBibA (figura 39), confirmando a capacidade de reconhecimento da proteína nativa na superfície do patógeno. Foi possível verificar um reconhecimento mais forte para os sorotipos Ia, II e III, em relação ao sorotipo V, o sorotipo usado para obter a sequência do gene *bibA* para expressão da proteína rBibA. Esses dados de reatividade cruzada são extremamente relevantes no contexto de obtenção de um antígeno vacinal capaz de reconhecer diferentes sorotipos de GBS.



**Figura 39.** ELISA de células inteiras realizado com diferentes sorotipos de GBS. Os anticorpos gerados em camundongos imunizados com rBibA-Alum se ligam à proteína nativa exposta na superfície das células GBS de diferentes sorotipos. Os títulos de anticorpos sorotipo-específicos foram determinados em dois experimentos independentes, em duplicatas. Os valores representam médias  $\pm$  DP dos títulos de IgG, usando *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.9.3 Imunofluorescência

Os soros policlonais produzidos contra GBS do sorotipo V, contra a proteína Sip e contra a proteína BibA foram utilizados para avaliação do reconhecimento da bactéria por meio de ensaio de imunofluorescência. Como pode ser verificado na figura 40, o GBS-V foi reconhecido pelo anticorpo comercial anti-*Streptococcus agalactiae* (224/46) (Novus Biologicals), assim como pelo soro policlonal gerado contra a bactéria (figura 39B) e os soros gerados contra as proteínas recombinantes BibA e Sip (figuras 40C e 40D). Esse resultado mostra que os soros gerados foram capazes de reconhecer os respectivos alvos na superfície bacteriana intacta, confirmando que os antígenos utilizados na imunização apresentam conformação correspondente à proteína nativa.



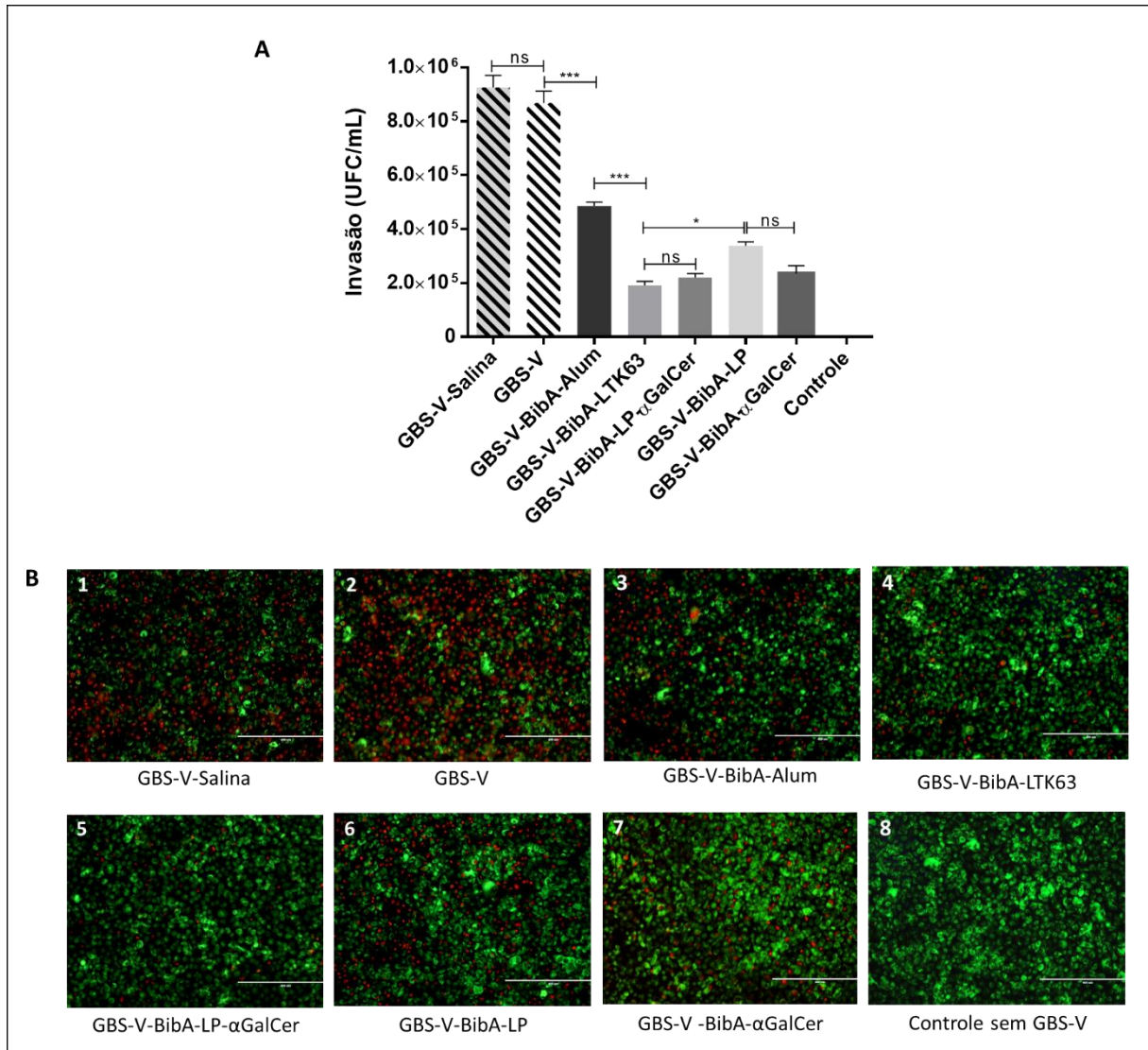
**Figura 40.** Avaliação da capacidade de reconhecimento de GBS-V pelos soros policlonais gerados por meio de imunização de camundongos Balb/c com as proteínas recombinantes Sip e BibA. A suspensão bacteriana foi fixada com formaldeído, bloqueada e incubada com o anticorpo primário correspondente na diluição de 1:100 e então incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à Alexa 488 (ThermoFischer). **A.** Anticorpo monoclonal anti-*Streptococcus agalactiae* (224/46) (Novus Biologicals). **B.** Soro policlonal gerado contra GBS-V (anti-GBS-V), **C.** Soro policlonal gerado contra a proteína BibA. **D.** Soro policlonal gerado contra a proteína Sip. Visualização em microscópio de fluorescência AMG EVOS *fl* LED. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

#### **4.9.4 Invasão de células epiteliais**

Um dos ensaios utilizados para avaliação *in vitro* da funcionalidade dos anticorpos anti-BibA foi o ensaio de invasão e morte de células epiteliais A549. Células A549 foram incubadas com o GBS-V previamente opsonizado com amostras de soro coletadas de camundongos vacinados. Como demonstrado na figura 41, as amostras de soro coletadas de camundongos imunizados por via i.n., com BibA associada a adjuvantes, foram capazes de proteger as células A549 com mais eficiência do que as células expostas ao GBS-V tratado com anticorpos gerados em animais imunizados com rBibA não adjuvantada ou na presença de Alum. É importante salientar que todas as amostras de soro testadas conferiram proteção à morte de células A549 em relação às células expostas ao GBS-V não opsonizado ou GBS-V tratado com amostras de soro de controle (grupo salina).

Respostas semelhantes foram analisadas por meio de marcação fluorescente dupla de células infectadas, utilizando laranja de acridina e brometo de etídio. A laranja acridina marca as células viáveis em verde, enquanto o brometo de etídio marca as células mortas, ou em processo de morte, em vermelho. Foi possível verificar a presença de muitas células vermelhas em amostras incubadas com GBS-V não opsonizado ou GBS-V incubado com soro controle (salina) (figura 41B). As células expostas ao GBS-V previamente opsonizado com amostras de soro provenientes de camundongos imunizados com rBibA-LTK63R ou BibA-LP- $\alpha$ GalCer apresentaram os menores valores de infecção de células epiteliais. Esses dados indicam que os soros gerados em camundongos imunizados com rBibA conferem imunidade protetora contra invasão pelo GBS do sorotipo V.

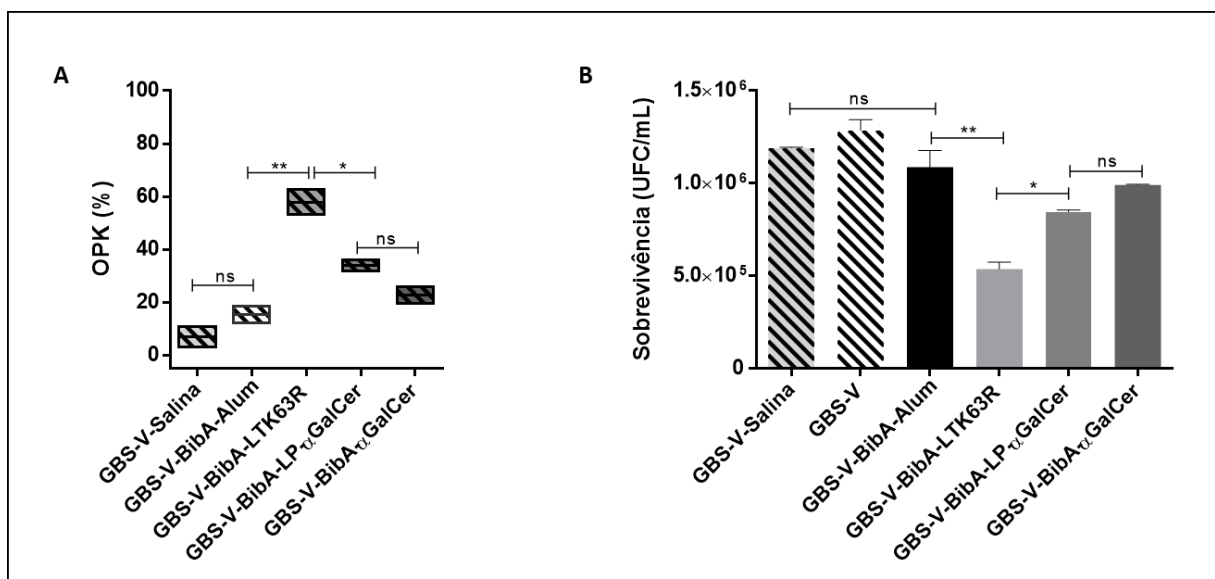




**Figura 41.** Ensaio de invasão de células A549 por GBS-V. Células de GBS-V foram pré-incubadas com soros policlonais provenientes de camundongos imunizados com diferentes formulações vacinais **A**. Quantificação das células de GBS-V após opsonização e incubação por 3 h a 37°C com células A549. As amostras lisadas foram plaqueadas em ágar-sangue e as colônias de GBS-V foram quantificadas. **B**. Sobrevivência de células A549 após exposição ao GBS-V previamente tratado com as diferentes amostras de soro. As células foram marcadas por coloração fluorescente dupla com laranja de acridina (células viáveis coradas em verde) e brometo de etídio (células mortas/em processo de morte coradas em vermelho), visualizadas sob o microscópio de fluorescência AMG EVOS fl LED. Os dados representam dois experimentos realizados independentemente em triplicatas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*  $p < 0,05$  representam diferenças significativas entre os grupos usando *one-way* ANOVA e pós-teste Tukey. ns: valores sem diferença estatisticamente significativa.

#### 4.9.5 Opsonofagocitose

Os papéis protetores dos anticorpos gerados em camundongos imunizados com as formulações de vacinais contendo rBibA foram avaliados também por meio do ensaio de morte por opsonofagocitose. O ensaio opsonofagocítico foi realizado com células de macrófagos J774, na presença de GBS-V previamente opsonizado com anticorpos anti-BibA obtidos a partir do soro de camundongos previamente imunizados. Os resultados demonstraram que os anticorpos séricos anti-rBibA obtidos a partir da imunização com rBibA associada à LTK63R promoveram um aumento estatisticamente significativo na morte de GBS-V por macrófagos quando comparado aos demais grupos testados (figura 42A). O efeito opsonofagocítico, embora com valores mais baixos, também foi detectado com amostras de soro coletadas de camundongos imunizados com rBibA associada à LP- $\alpha$ GalCer. Soro gerado contra BibA-  $\alpha$ GalCer ou BibA-Alum não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados com o grupo controle (salina). O número de células de GBS-V sobreviventes à fagocitose nos grupos salina ou não tratados não apresentou diferença quando comparado ao soro gerado contra BibA-Alum (figura 42B).

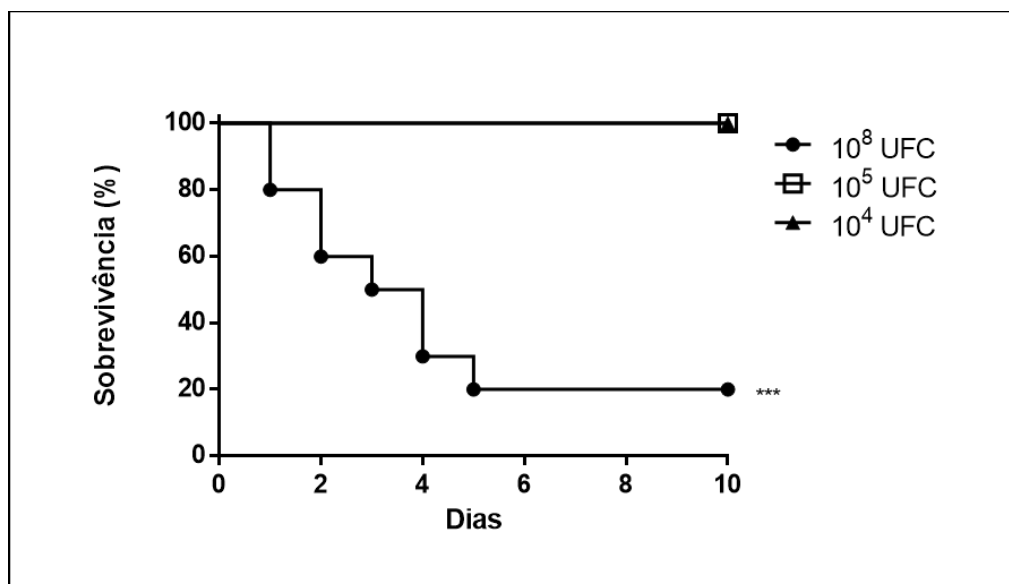


**Figura 42.** Avaliação da imunidade protetora dos soros gerados em camundongos imunizados com as formulações de vacinais contendo rBibA. **A.** Ensaio de morte por opsonofagocitose (OPKA) utilizando células J774 e GBS-V previamente tratado com soros policlonais provenientes de camundongos imunizados. O GBS-V opsonizado foi incubado com células J774 por 1 h a 37°C. **B.** Sobrevivência de GBS-V após opsonização e exposição a células J774. Os dados representam dois experimentos realizados de forma independente, em duplicatas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP. \*\* $p < 0.01$  e \* $p < 0.05$  representam diferenças significativas entre os grupos usando *one-way* ANOVA pós-teste de Tukey. ns: valores sem diferenças estatisticamente significante.

## 4.10 DESAFIO DE MODELOS ANIMAIS

### 4.10.1 Desafio letal

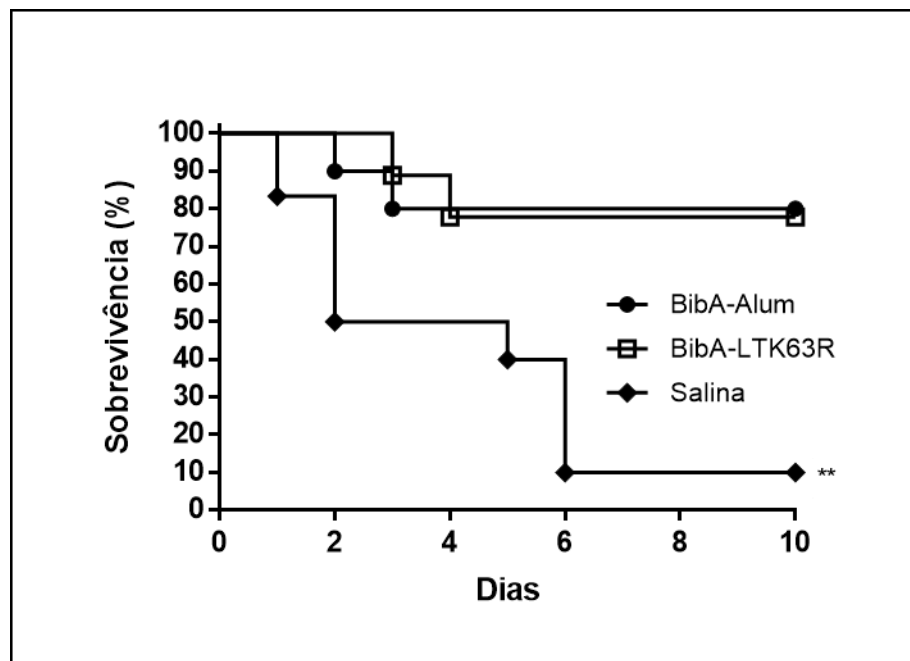
Com o intuito de determinar a  $DL_{50}$  e  $DL_{90}$  para células de GBS-V, camundongos da linhagem C57BL/6 foram desafiados por via intraperitoneal com  $10^8$ ,  $10^5$  e  $10^4$  UFC de GBS do sorotipo V (2603 V/R). Animais desafiados com  $10^8$  UFC apresentaram sinais de doença já nas primeiras 24 horas. Os sinais apresentados inicialmente foram perda de apetite, pelame eriçado e perda dos movimentos dos membros inferiores. Ao final de 10 dias, a mortalidade nesse grupo foi de 80% (figura 43). Ainda, um dos animais sobreviventes apresentou todos os sinais da doença, mas conseguiu se recuperar. Esse animal ficou com uma seqüela do processo de infecção, resultando na diminuição dos movimentos na pata anterior esquerda. Os grupos desafiados com  $10^5$  e  $10^4$  UFC de GBS-V não apresentaram sinais de doença, mantendo-se saudáveis durante todo o período de acompanhamento do experimento.



**Figura 43.** Curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 após desafio intraperitoneal com diferentes doses de GBS-V ( $10^8$ ,  $10^5$  e  $10^4$  UFC). A porcentagem de sobrevivência foi avaliada durante 10 dias. Dados representativos de um experimento ( $n = 10$  animais por grupo). Teste Log-rank - Mantel-Cox, \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Após padronização do desafio letal em camundongos da linhagem C57BL/6, animais foram imunizados com as formulações vacinais capazes de induzir maiores títulos de IgG BibA-específicos, sendo estas BibA-Alum e BibA-LTK63R. Para avaliação da imunidade protetora conferida pelas formulações vacinais estudadas, ao final do regime vacinal de 3 doses, os animais imunizados foram desafiados por via i.p. com  $1 \times 10^8$  UFC de GBS do sorotipo V e a sobrevivência dos animais foi avaliada durante o período de 10 dias. Como pode ser

verificado na figura 44, os grupos previamente imunizados com a proteína rBibA associada à diferentes adjuvantes foram protegidos contra o desafio letal, resultando em ambos os casos em um índice de sobrevivência de 80%. Por outro lado, o grupo tratado apenas com solução salina apresentou um índice de letalidade de 90%, e os animais sobreviventes apresentaram sequelas motoras, provavelmente devido a distúrbios neurológicos causados pela infecção por GBS-V. Tomados em conjunto, esses dados sugerem que formulações vacinais contendo o antígeno BibA são capazes de conferir proteção contra infecções por GBS-V.



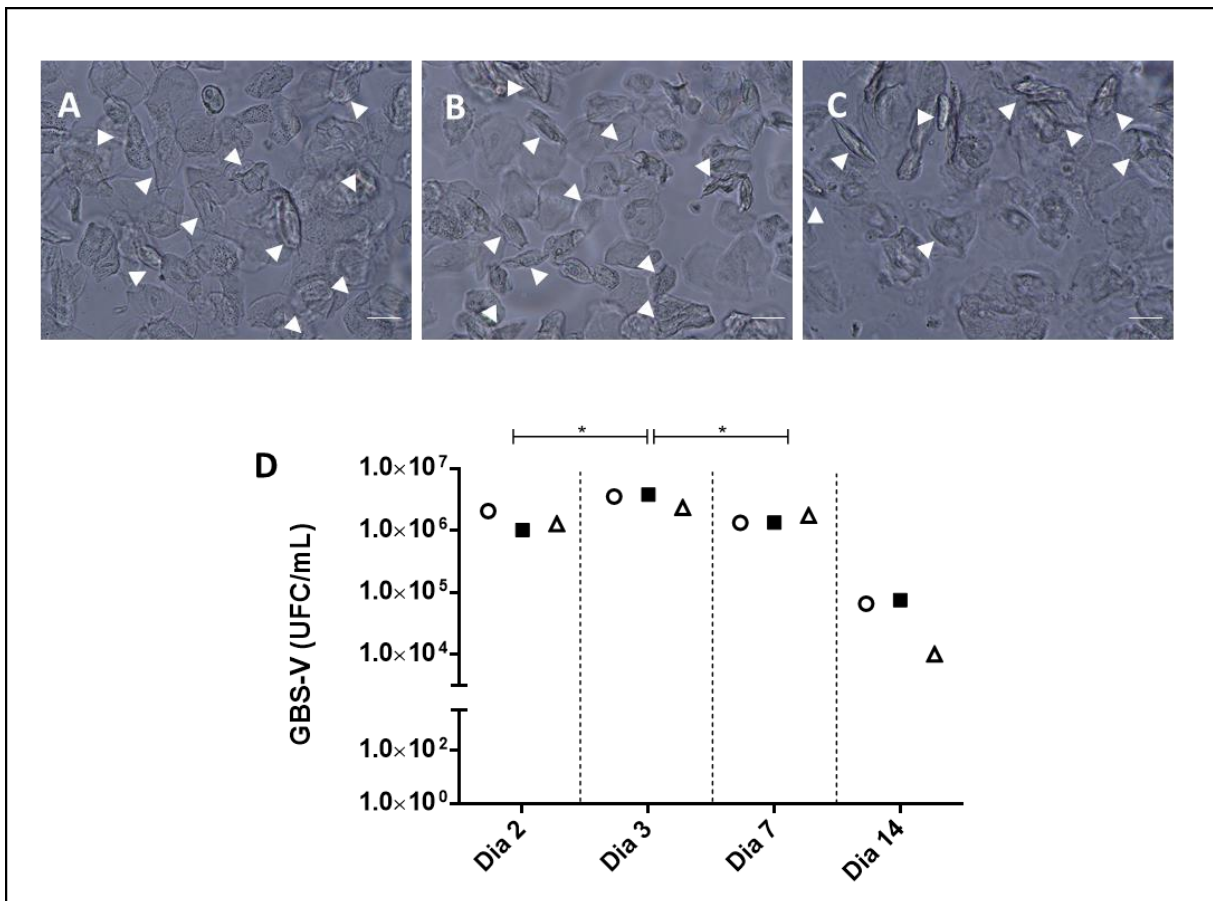
**Figura 44.** Imunidade protetora frente ao desafio letal por administração i.p. de GBS-V. Curvas de sobrevivência de camundongos C57BL/6 previamente imunizados com rBibA-Alum (quadrados fechados), BibA-LTK63R (círculos abertos) e salina (triângulos fechados) e desafiados por via i.p. com  $1 \times 10^8$  UFC de colônia de GBS-V. A porcentagem de sobrevivência foi avaliada durante 10 dias. Dados representativos de um experimento realizado em duplicata (n=10 animais por grupo). Teste Log-rank - Mantel-Cox, \*\*p < 0,001.

#### 4.10.2 Desafio de colonização vaginal

De acordo com dados da literatura, escolheu-se adotar a concentração de  $5 \times 10^7$  UFC de GBS-V para padronização do protocolo de colonização vaginal de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6. Previamente, as fêmeas foram submetidas a sincronização do ciclo estral por meio da administração i.p. de 0,5 mg de acetato de medroxiprogesterona (Depo-Provera®). A análise dos lavados vaginais, coletados 24 horas após o tratamento, confirmou a sincronização das fêmeas na fase de estro tardio (Figura 45A-C).

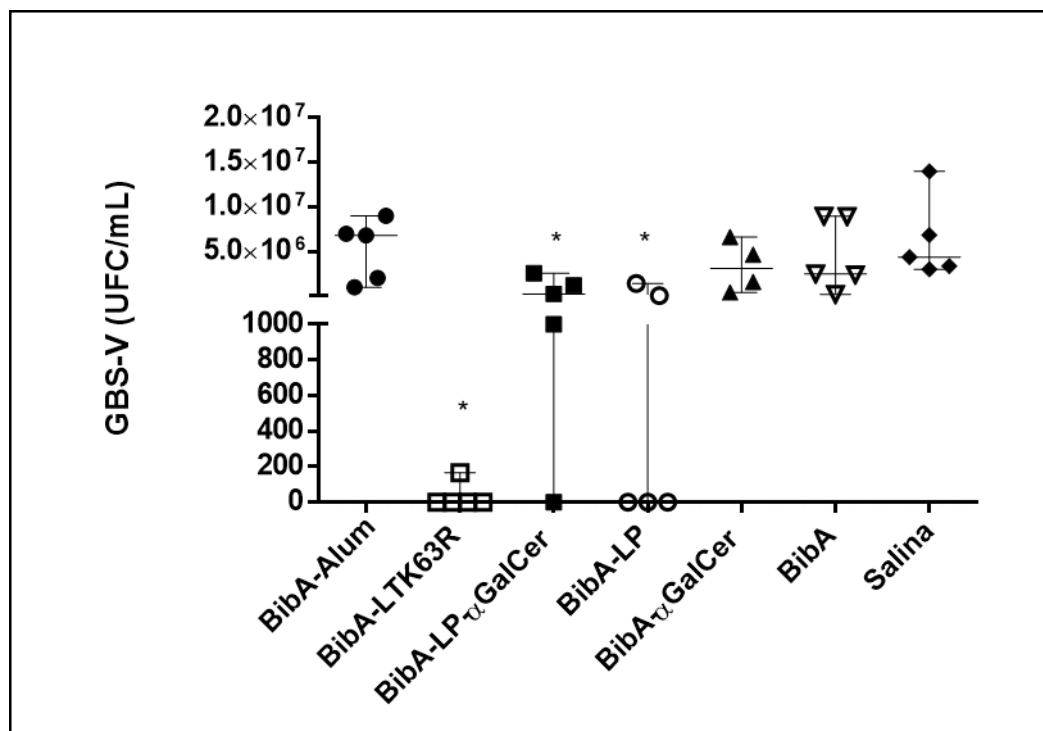
Tentativas prévias de colonização vaginal com a administração de 50  $\mu$ L de volume de cultura bacteriana, segundo descrito por Baker e colaboradores (2017), não foram eficazes

devido ao extravasamento da amostra devido à capacidade do canal vaginal das fêmeas. Portanto, os desafios foram conduzidos por meio da inoculação de 10  $\mu\text{L}$  de solução bacteriana ( $5 \times 10^7$  UFC) no canal vaginal, na presença de gelatina, por meio de pipetagem. Os dados obtidos a partir do plaqueamento das diluições dos lavados vaginais foram coerentes, havendo diminuição no número de colônias nas amostras coletadas no 14º dia após o desafio de colonização (figura 45D). Esse padrão de decaimento mais lento na quantidade de bactérias recuperadas a partir de amostras do lavado vaginal é mais coerente para realizar o acompanhamento da eficácia de uma formulação vacinal em induzir proteção contra o processo de colonização vaginal dos camundongos.



**Figura 45.** Padronização do protocolo de colonização vaginal de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6. **A,B,C.** Amostras vaginais de camundongos administrados por via i.p. com 0,5 mg de acetato de medroxiprogesterona (Depo-Provera®). 24 horas após tratamento, as amostras foram avaliadas sob o microscópio AMG EVOS, confirmando sincronização na fase de estro (tardio). Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . Setas brancas indicam células epiteliais escamosas. **B.** Lavados vaginais de animais colonizados com  $5 \times 10^7$  UFC de GBS-V foram coletados nos dias 2, 3, 7 e 14. O número de UFC de GBS-V foi quantificado por meio de plaqueamento das diluições seriadas dos lavados vaginais em meio seletivo. Dados de um experimento representativo ( $n = 3$  animais). Os resultados são apresentados como valores individuais. \*  $p < 0,05$  representa diferenças significativas entre dados de colonização usando *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

Para determinação da imunidade protetora induzida pela imunização com rBibA, camundongos vacinados foram submetidos ao desafio de colonização vaginal. Como demonstrado na figura 46, 80% dos camundongos imunizados com a formulação vacinal rBibA-LTK63R foram protegidos da colonização vaginal por GBS-V. Além disso, as formulações vacinais baseadas na combinação de rBibA e lipossoma, ou lipossoma e  $\alpha$ -GalCer, foram capazes de proteger 20 e 60% dos animais contra colonização vaginal, respectivamente. Imunização com rBibA adjuvantada com Alum ou  $\alpha$ -GalCer não foram capazes de induzir proteção contra o desafio, apresentando resultados similares aos grupos imunizados com BibA não adjuvantada e ao grupo salina.

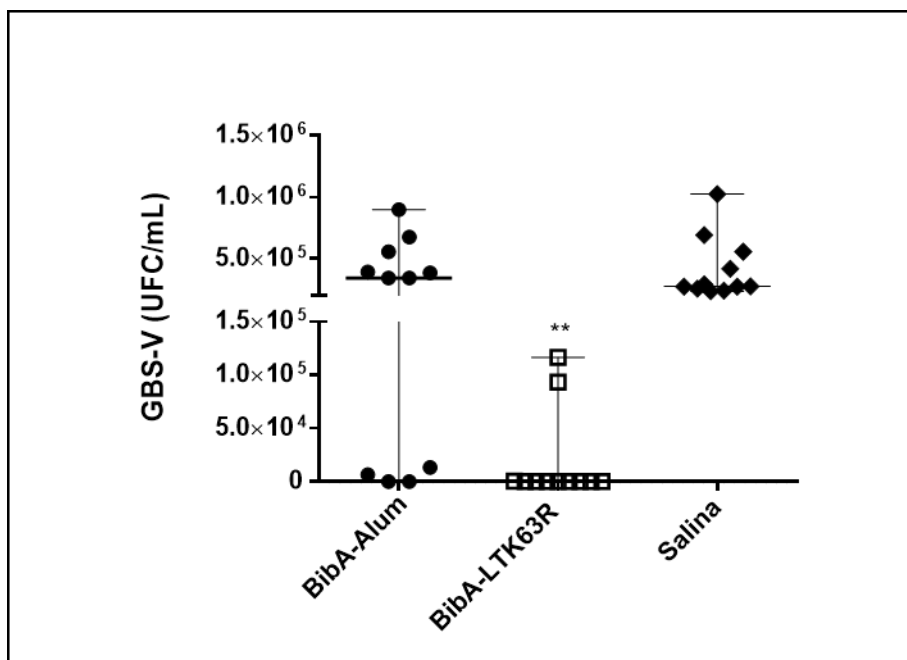


**Figura 46.** Imunidade protetora à colonização vaginal por GBS-V. Camundongos imunizados foram submetidos à colonização vaginal com  $5 \times 10^7$  UFC de GBS-V ( $n = 5$  por grupo). Lavados vaginais foram coletados 3 dias após a colonização. As colônias foram recuperadas em placas de ágar-sangue. Experimento repetido duas vezes com resultados semelhantes. Os resultados são apresentados como medianas. \*  $p < 0,05$  representa diferenças significativas entre os grupos comparados com o grupo salina, usando *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett.

#### 4.10.3 Imunidade passiva

Os soros policlonais gerados em camundongos imunizados com BibA-Alum, BibA-LTK63R ou solução salina (grupo controle), também foram testados quanto à capacidade de promover proteção passiva contra a colonização vaginal por GBS-V. Para esse fim, bactérias

previamente tratadas com os respectivos soros foram usadas na colonização vaginal de camundongos naïve. O tratamento de células de GBS-V com o soro gerado em camundongos imunizados com BibA-LTK63R mostrou uma redução significativa na colonização dos animais, resultando em uma taxa de proteção de 80% em relação aos camundongos desafiados com GBS-V tratado com o soro salina (figura 47). Camundongos desafiados com GBS-V tratado com soro coletado de camundongos imunizados com BibA-Alum mostraram uma taxa de proteção de 40% frente à colonização vaginal por GBS-V. Tomados em conjunto, esses dados confirmam o papel protetor dos anticorpos gerados contra formulações vacinais baseadas na proteína rBibA purificada derivada de GBS-V, protegendo camundongos tanto contra desafio letal, quanto contra o processo de colonização vaginal com GBS-V.



**Figura 47.** Proteção passiva conferida à colonização vaginal por GBS usando soros imunes anti-rBibA. Camundongos fêmeas naïve foram submetidos à colonização vaginal com  $5 \times 10^7$  UFC de GBS-V, previamente tratados com soros gerados contra BibA-Alum, BibA-LTK63R ou solução salina ( $n=10$  camundongos por grupo). Lavados vaginais foram coletados 3 dias após a colonização. As colônias foram contadas após plaqueamento em ágar-sangue. Este experimento foi realizado duas vezes, com resultados semelhantes obtidos em ambas as tentativas. Os resultados são apresentados como medianas. \*\*  $p < 0,001$  representa diferenças significativas entre os grupos comparados com o grupo salina usando *one-way* ANOVA com pós-teste de Dunnett.

## 5 DISCUSSÃO

O Estreptococo do grupo B ainda é a principal causa de morbidade e mortalidade em crianças, cujas taxas de mortalidade podem atingir 10 a 15% de todos os recém-nascidos infectados, refletindo a importância da prevenção da infecção neonatal (SCHORNER, 2014). Como a colonização do trato genital materno é o fator primário de risco para a infecção de recém-nascidos, a profilaxia intraparto com antibióticos foi adotada como medida de prevenção de infecções causadas por GBS em neonatos. O GBS é uniformemente sensível à penicilina, no entanto, isolados com sensibilidades reduzidas à penicilina tem sido relatados desde 2008. Isolados de GBS no Japão apresentaram substituições em aminoácidos adjacentes a dois motivos conservados da PBP 2X (*penicillin binding protein*) (KIMURA et al., 2008). Estudos realizados com pneumococo mostraram que a alteração do gene *pbp2x* é o primeiro evento para levar à resistência completa à penicilina (HAKENBECK et al., 1999). Além dos dados de resistência obtidos a partir de cepas isoladas no Japão, aumentos nas taxas de resistência aos antibióticos clindamicina ou eritromicina tem sido detectados em várias regiões do mundo, incluindo Europa, Ásia, América do Norte e América do Sul (DUTRA et al., 2014).

Esses dados são de extrema relevância no contexto da adoção da profilaxia intraparto utilizada para a prevenção de infecções neonatais por GBS, já que o primeiro antibiótico de escolha é penicilina G. O surgimento de uma cepa com resistência completa à penicilina, associado ao crescente número de cepas resistentes a macrolídeos e lincosamidas, que são os antibióticos administrados em gestantes com alergia à penicilina, são fatores que contribuem para a necessidade do desenvolvimento de medidas profiláticas que evitem a disseminação de infecções neonatais por GBS, sendo a vacinação a principal delas. Além disso, a adoção da profilaxia antibiótica intraparto não impede a ocorrência de infecções de início tardio, bem como a ocorrência de infecção ascendente por GBS, responsável por prematuridade e óbitos relacionados ao GBS (BOLDENOW et al., 2016). Nesse contexto, uma formulação vacinal capaz de reduzir o número de infecções por GBS em recém-nascidos caracteriza uma alternativa viável de prevenção. Nesse cenário, em 2015, a organização mundial da saúde (WHO) identificou como prioridade o desenvolvimento de uma vacina contra o GBS voltada para a imunização materna (VEKEMANS et al., 2019).

No passado, os principais esforços voltados para a obtenção de uma vacina contra o GBS estiveram concentrados no desenvolvimento de vacinas conjugadas multivalentes, compostas por polissacarídeos dos sorotipos Ia, Ib, II, III e V e por um componente proteico,



visando o aumento da resposta imunológica contra os polissacarídeos contidos na formulação vacinal. No entanto, devido às limitações relacionadas ao desenvolvimento de vacinas polissacarídicas, os esforços passaram a ser concentrados na busca de uma proteína de superfície comum entre as cepas de GBS (GRAVEKAMP et al., 1999). Vários autores sugeriram o uso de um antígeno proteico altamente conservado entre as cepas de GBS como um método de grande potencial para a prevenção de infecções neonatais causadas por esse microrganismo, caracterizada como uma alternativa com menores custos de produção e maior cobertura em relação às formulações vacinais baseadas em polissacarídeos (JOHRI et al., 2006).

É por esse motivo que a este trabalho esteve focado no desenvolvimento de uma estratégia vacinal baseada em antígenos proteicos para a prevenção de doenças infecciosas causadas por GBS. A escolha dos antígenos vacinais BibA e Sip foi baseada em estudos anteriores que demonstraram a capacidade de ativação do sistema imunológico, bem como a frequência desses antígenos em diferentes cepas do patógeno. A relação filogenética da proteína Sip em isolados de GBS mostrou que esta proteína possui uma alta homologia entre as cepas que colonizam humanos, bovinos e tilápias (PEREIRA et al., 2013). Estudos apontam que essa proteína foi capaz de proteger camundongos contra isolados de GBS de humanos e de gado, fator que a torna um candidato vacinal efetivo para a indução de proteção contra infecções por GBS.

Outra proteína de superfície imunogênica de GBS é a adesina bacteriana BibA. Esta proteína possui alto grau de conservação dentre as cepas de GBS e está ancorada na parede celular do GBS. Esta proteína caracteriza um fator de virulência que contribui para a resistência à fagocitose (SANTI et al., 2007), tornando-se um candidato vacinal de grande interesse. No entanto, trabalhos anteriores realizados com a proteínas BibA não demonstraram a habilidade desta proteína em promover proteção contra colonização ou desafio letal em camundongos, nem detalharam a capacidade de bloqueio do processo de invasão das células epiteliais do hospedeiro.

Inicialmente, o antígeno Sip foi clonado em vetores para expressão heteróloga em *B. subtilis*. Essa abordagem foi baseada nos resultados obtidos em trabalhos previamente desenvolvidos no laboratório, utilizando a expressão heteróloga da proteína de superfície P1 de *S. mutans* em cepas de *B. subtilis* (TAVARES et al., 2010). No entanto, foram encontrados problemas nas etapas de clonagem e expressão da proteína alvo. Várias tentativas de transformação não resultaram na obtenção de clones positivos para expressão do antígeno vacinal em *B. subtilis*, especialmente devido à dificuldade no preparo de células competentes

para transformação. Por esse motivo, escolhemos realizar a expressão dos antígenos vacinais em cepas de *E. coli*.

A escolha do sistema de expressão bacteriano *E. coli* deu-se principalmente pelas suas vantagens, como facilidade no processo de escalonamento, menor custo de produção e alto rendimento de proteínas ao final do processo. A obtenção do antígeno BibA em *E. coli* BL21(DE3) foi alcançada com sucesso, obtendo-se um rendimento de 4g/L de indução. Quanto à proteína Sip, foi possível obter um rendimento de 1 g/L de proteína a partir da fração solúvel expressa em *E. coli* BL21(DE3), no entanto, a mesma sofreu perdas por precipitação durante o processo de purificação. Além disso, durante a tentativa de escalonamento da produção da proteína Sip, muitas das condições testadas resultaram na formação de corpos de inclusão, ou seja, na expressão insolúvel do antígeno.

Vários autores descreveram que ao expressar proteínas recombinantes em bactérias, um dos efeitos secundários mais comuns é a formação de corpos de inclusão (BANEYX; MUJACIC, 2004; LIOVIC et al., 2012), que são agregados de proteínas com conformações não nativas. Os processos clássicos de renaturação de proteínas a partir de agregados em corpos de inclusão requerem o uso de agentes desnaturantes químicos fortes em altas concentrações. Comumente, agregados de proteínas são solubilizados em agentes caotrópicos fortes como 6 M de hidrocloreto de guanidina ou 8 M de uréia (CLARK, 2001). Portanto, solubilizar os corpos de inclusão e proporcionar condições para o correto enovelamento das proteínas solubilizadas em sua forma bioativa é uma tarefa desafiadora.

Devido à expressão da proteína Sip na forma insolúvel em *E. coli* BL21(DE3), buscou-se uma modificação no sistema de expressão visando a obtenção da expressão da proteína na fração solúvel. Uma abordagem amplamente utilizada é a diminuição da temperatura de expressão, fator que pode auxiliar o polipeptídeo a ser enovelado corretamente, dando à maquinaria celular um tempo maior para promover o enovelamento das estruturas terciárias e quaternárias do polipeptídeo (SAMBROOK, J; RUSSEL, 2001). A expressão da proteína Sip realizada em temperaturas mais baixas, ou utilizando cepas específicas, como a Arctic Express, que é capaz de expressar chaperoninas que auxiliam no enovelamento de proteínas, não possibilitaram a obtenção da proteína na fração solúvel. Diante desses problemas, não foi possível obter grandes quantidades do antígeno vacinal purificado a partir dos corpos de inclusão expressos em *E. coli* BL21(DE3).

As proteínas recombinantes Sip e BibA foram utilizadas para imunização de camundongos da linhagem Balb/c, na presença do adjuvante LT-1. Ambas as proteínas foram capazes de induzir a produção de soro policlonal antígeno-específico, confirmando a

imunogenicidade das proteínas de superfície por meio do aumento dos títulos de anticorpos gerados após cada dose de imunização. Esses soros policlonais puderam, por sua vez, ser utilizados em ensaios de imunofluorescência e imunodeteção das proteínas e células de GBS, sendo capazes de reconhecer a células de GBS intactas em ensaios de ELISA.

Como a rBibA foi expressa com sucesso em *E. coli* BL21 (DE3), resultando em um alto rendimento de proteína recombinante pura, a mesma foi submetida a caracterização estrutural. A análise da proteína BibA por CD revelou uma organização secundária alfa-hélice predominante, compatível com estudos anteriores (SANTI et al., 2007), possibilitando seu uso como um antígeno de vacinal. Além disso, a estabilidade térmica do antígeno foi determinada utilizando o sistema Tycho. Foi possível verificar a qualidade do antígeno vacinal, resultando em uma proteína estruturada e com uma estabilidade térmica de aproximadamente 74°C de temperatura de transição. Os dados de sensibilidade do antígeno à desnaturação térmica são de extrema relevância, já que proteínas termoestáveis são menos propensas à perda de estrutura e função induzida pela temperatura, não requerendo sistemas complexos de refrigeração. Um antígeno com maior estabilidade térmica pode contribuir para a redução de custos referentes à logística necessária para garantir a integridade da formulação vacinal, conhecida como cadeia de frio (HILL et al., 2016).

Diferentes abordagens para a entrega de antígenos foram utilizadas no desenvolvimento de vacinas contra GBS (XUE et al., 2010; BAKER et al., 2017). As vias parenterais, como injeções subcutâneas ou intramusculares, são potentes indutores de respostas sistêmicas, mas geralmente não conseguem induzir imunidade da mucosa ou promovem níveis mais baixos de respostas imunes locais em comparação com a imunização da mucosa (LYCKE, 2012). Além disso, a aplicação de vias parenterais requer maiores recursos financeiros e níveis mais altos de esforço organizacional (GUPALOVA et al., 2018).

Por outro lado, a vacinação por via mucosa pode induzir respostas humorais e celulares antígeno-específicas nos compartimentos sistêmico e mucoso (LYCKE, 2012). Além disso, as vacinas administradas por vias mucosas possuem uma série de vantagens em relação às vacinas injetáveis, como baixo risco de disseminação de doenças transmitidas pelo sangue, não há necessidade de pessoal treinado para administração da vacina, além de poder gerar uma resposta imune no sítio de entrada da maioria dos agentes patogênicos (DEMAGISTRIS, 2006). Tomados em conjunto, esses dados sustentam que a adoção da vacinação por via mucosa é uma boa alternativa para o nosso propósito, considerando que esta abordagem pode levar à indução de níveis mais altos de proteção contra patógenos da mucosa, como é o caso do GBS.

Alguns antígenos são pouco imunogênicos e precisam ser associados a adjuvantes para potencialização da resposta imune induzida. Nossa abordagem foi baseada na comparação da via parenteral (subcutânea – s.c.), usando o Alum como adjuvante e a imunização por via mucosa (intranasal – i.n. e vaginal), usando LTK63R,  $\alpha$ -GalCer e lipossoma, uma vez que a indução de respostas imunes robustas por vias mucosas geralmente requer a coadministração de adjuvantes (HOLMGREN; CZERKINSKY, 2005). Nós demonstramos que a imunização com rBibA, proveniente de GBS do sorotipo V (2603 V/R), associada aos diferentes adjuvantes testados foi capaz de induzir respostas sistêmicas de IgG. Além disso, em comparação com os demais grupos, os soros gerados contra BibA-Alum apresentaram maior afinidade com o alvo em ensaios de ELISA de tiocianato de amônio, requerendo maiores concentrações do reagente para dissociação dos anticorpos. Entretanto, estudos anteriores avaliando respostas imunes contra *S. pneumoniae* sugeriram uma baixa influência na avidéz de anticorpos no processo como fagocitose e proteção do hospedeiro (LEFEBER et al., 2003), corroborando com nossos dados.

Mesmo com menores níveis de avidéz, os soros gerados após imunização com BibA-LTK63R foram capazes de induzir níveis mais altos de fagocitose de GBS em ensaio *in vitro*, um importante processo para promoção da morte de células de GBS. Mesmos com efeitos menos acentuados, formulações vacinais contendo BibA associada a lipossoma e  $\alpha$ -GalCer, também apresentaram menor avidéz ao antígeno em ensaio de ELISA de tiocianato, mas maior habilidade em promover a fagocitose de GBS. Um aspecto relevante em relação à funcionalidade das respostas séricas de anticorpos é a especificidade ao epítipo. Estudos anteriores demonstraram que os derivados de LT podem modular as respostas da subclasse de IgG, aumentando a especificidade dos anticorpos epítipo-específicos em comparação a outros adjuvantes (BATISTA et al., 2017; MAEDA et al., 2017).

A maior parte das formulações vacinais induziu uma produção maior da subclasse IgG1, resultando em níveis significativamente elevados para a formulação baseada em BibA-Alum. No entanto, os adjuvantes LTK63R e  $\alpha$ -GalCer também promoveram a modulação da resposta humoral, levando a um padrão de subclasse de IgG misto (Th1/Th2), com predomínio de IgG1, sugestivo de resposta voltada para um perfil Th2, corroborando com dados da literatura (RYAN et al., 1999; SINGH et al., 1999). Por outro lado, mesmo apresentando níveis balanceados de IgG1/IgG2c, a imunização com BibA-LP- $\alpha$ GalCer levou a um estímulo maior da expressão de IgG2c, resultado da indução de um perfil de resposta Th1, corroborando com trabalhos anteriores que fizeram o uso de lipossomas baseados em

DPPC-colesterol (BADIEE et al., 2012). Esses dados confirmam que todos os adjuvantes testados foram capazes de modular a resposta imune humoral.

É importante enfatizar que os soros gerados contra BibA-Alum foram capazes de reconhecer todos os sorotipos responsáveis pela maior parte das doenças invasivas em recém-nascidos e adultos - Ia, Ib, II, III e V (SKOFF et al., 2009; NUCCITELLI; RINAUDO; MAIONE, 2015). Essa reatividade cruzada é de extrema importância no contexto do desenvolvimento de vacinas contra GBS, corroborando para superar a substituição de sorotipos e permitindo que o antígeno BibA seja usado como um componente vacinal em diferentes regiões geográficas. Esses dados superam os resultados obtidos durante as últimas décadas testando formulações vacinais baseadas no uso do polissacarídeo capsular, cuja principal limitação é a indução de respostas imunes somente contra o sorotipo capsular utilizado na formulação da vacinal (BELARD et al., 2015). Além disso, o soro gerado contra a proteína BibA também foi capaz de reconhecer células de GBS-V por meio de ensaios de imunofluorescência, abrindo perspectivas para a avaliação desses anticorpos em outros ensaios *in vitro*.

Diferentemente de Alum e  $\alpha$ -GalCer, a administração de BibA associada a LTK63R e lipossoma, por via i.n., levou à indução da imunoglobulina A secretada nas vias respiratórias superior e inferior e no trato genital, o mesmo padrão de resposta descrito em trabalhos anteriores usando imunização por via intranasal (PEDERSEN; COX, 2012). Como descrito por Baker e colaboradores (2017), a administração de GBS por via i.n. foi capaz de induzir respostas imunes locais e sistêmicas imunes relacionadas ao aumento da depuração de patógeno. Além disso, a resistência à infecção pode ser correlacionada com anticorpos SIgA específicos, que servem como barreira imunológica nas superfícies mucosas (CORTHÉSY, 2013). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a indução local de IgA observada em nossos resultados é um fator importante que pode conferir proteção contra a colonização por GBS, o primeiro passo para a doença invasiva por GBS.

Em relação à resposta imunológica celular, algumas dificuldades foram encontradas na realização dos experimentos de marcação celular. O perfil polifuncional de produção de citocinas não pode ser avaliado. Nós esperávamos encontrar altos níveis de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, já que monócitos, macrófagos e neutrófilos produzem estas citocinas pró-inflamatórias que participam da ativação e recrutamento de células imunes durante o processo de infecção por GBS (CURRIE et al., 2011; FLAHERTY et al., 2019). Por outro lado, o perfil de proliferação de linfócitos B, T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> mostrou que as formulações vacinais baseadas em BibA, associadas a adjuvantes, foram capazes de induzir a proliferação destas populações celulares.

Por outro lado, BibA não adjuvantada ou associada a  $\alpha$ -GalCer não levaram à indução da proliferação de células B. Esse resultado não é esperado para  $\alpha$ -GalCer, já que este imunomodulador é descrito como um forte estimulador de células B, induzindo sua proliferação e diferenciação (CHEN; MOSOVSKY; ROSS, 2013).

A capacidade de GBS em formar biofilme tem sido um foco de atenção para uma possível função na virulência desse patógeno (D'URZO et al., 2014). Estudos têm mostrado que isolados humanos de GBS podem formar biofilmes, tanto em superfícies bióticas quanto em superfícies abióticas (RINAUDO et al., 2010; NUCCITELLI; RINAUDO; MAIONE, 2015). Portanto, a padronização do ensaio de formação de biofilme em microplaca poderia auxiliar o processo de avaliação dos anticorpos gerados contra o antígeno BibA, adotando como parâmetro a capacidade destes em reduzir ou inibir a formação de biofilme. No entanto, nos ensaios realizados pelo nosso grupo, a formação de biofilme e microplaca apresentou resultados extremamente variáveis, mesmo na presença de agentes para fixação. A funcionalidade dos anticorpos gerados em inibir a formação de biofilme é um fator extremamente relevante, já que vários autores têm mostrado que a formação de biofilme é uma barreira que protege o patógeno contra antibióticos e também contra a pressão do sistema imune (RINAUDO et al., 2010; D'URZO et al., 2014).

Nosso trabalho utilizou diferentes ensaios *in vitro* para avaliação da funcionalidade dos anticorpos gerados a partir das imunizações com os antígenos vacinais. Como a proteção contra GBS envolve mecanismos de opsonização e fagocitose (HENNEKE; BERNER, 2006), ensaios de fagocitose utilizando macrófagos podem ser extremamente relevantes para avaliação do aumento da fagocitose do patógeno mediada por anticorpos específicos. Levando em consideração a capacidade do antígeno BibA em promover ao patógeno a capacidade de evadir das repostas do sistema imunológico do hospedeiro, nossos dados demonstraram que o GBS opsonizado com soros gerados por meio da administração de BibA-LTK63R resultou em maiores índices de morte por opsonofagocitose (60%) se comparado aos demais soros dos grupos imunizados. Soros gerados por meio da imunização de camundongos com BibA associada a lipossoma e  $\alpha$ -GalCer também foram capazes de aumentar os índices de morte por fagocitose, se comparados com o grupo imunizado com BibA-Alum, reforçando que a maior avidéz desse soro em ensaios de ELISA de tiocianato de amônio não reflete a sua funcionalidade, como previamente descrito por Lefeber e colaboradores (2003).

Determinantes de GBS que contribuem para a adesão e colonização celular incluem proteínas de superfície que facilitam a adesão aos constituintes da matriz extracelular (PATRAS et al., 2015). Portanto, outra forma de avaliar a funcionalidade de anticorpos é

através da realização de ensaios de neutralização *in vitro*, utilizando linhagens celulares. A neutralização pode ser definida como a capacidade de um anticorpo em inibir a infecção de células susceptíveis, ou no caso de alguns organismos extracelulares, em inibir um passo patogênico inicial (FORTHAL, 2014).

Como a adesão é um pré-requisito para invasão celular, nós avaliamos se as respostas imunes contra o antígeno BibA poderiam diminuir o processo de invasão celular. Nossos resultados confirmam que, na presença de soros gerados após imunização com BibA nós obtivemos uma redução na invasão de células epiteliais por GBS-V em comparação aos controles. Esses dados sugerem fortemente que os soros criados contra o antígeno BibA podem bloquear o primeiro passo da colonização por GBS. Como a adesão às células epiteliais do hospedeiro caracteriza um passo central na patogênese do GBS (SHABAYEK; SPELLERBERG, 2018), os anticorpos direcionados à adesina BibA podem prejudicar o processo de adesão, reduzindo a capacidade de invasão do GBS e contribuindo para a prevenção de infecções invasivas.

Fatores bacterianos e do hospedeiro ainda não são completamente compreendidos na patogênese do GBS. Estudos anteriores com o antígeno BibA não exploraram o papel das respostas imunes na promoção proteção contra o processo de colonização ou invasão (SANTI et al., 2009a), etapas críticas para a patogênese do GBS. Estudos investigando a função da imunidade humoral na eliminação da colonização vaginal *in vivo* mostraram que camundongos deficientes em células B ou com ausência do receptor Fc (mediador do transporte de IgG para a mucosa vaginal), exibiram uma colonização vaginal por GBS mais prolongada. Ainda, um estudo recente utilizando a imunização pela via intranasal com a bactéria resultou na indução de respostas imunes de mucosa e sistêmica, diminuindo a duração da colonização (BAKER et al., 2017).

Para avaliar a proteção induzida pelas formulações vacinais contendo o antígeno BibA, nós padronizamos os ensaios de desafio letal e de colonização vaginal em camundongos da linhagem C57BL/6. Nossos dados demonstraram que o desafio vaginal com o GBS do sorotipo V foi capaz de prevenir a colonização em 80% dos camundongos imunizados com a formulação vacinal BibA-LTK63R. Baker e colaboradores (2017), sugeriram que, contra patógenos da mucosa genital, a vacinação por via mucosa poderia fornecer proteção superior, favorecendo a eliminação do GBS, corroborando com nossos resultados de proteção.

Quanto ao desafio letal, nossos resultados mostraram que ambos os camundongos imunizados por via parenteral ou mucosa foram eficientes em aumentar as respostas de

anticorpos e bloquear o GBS. Esses dados caracterizam um fator muito importante para a prevenção da bacteremia na recém-nascidos e idosos. Além disso, a avaliação da proteção passiva contra a colonização vaginal por GBS confirmou o papel protetor dos anticorpos gerados contra a proteína rBibA purificada, em associação ao adjuvante LTK63R, promovendo 80% de proteção contra colonização vaginal em camundongos *naïve*. Todos esses dados corroboram que a proteína BibA caracteriza um antígeno potente, capaz de elucidar respostas imunes protetoras contra a colonização e infecção por GBS.

Uma vacina administrada a mulheres grávidas pode ser uma ferramenta mais poderosa para prevenir doenças causadas por GBS, protegendo mães e crianças (MADHI et al., 2013). Nossos dados apoiam fortemente que a imunização com BibA pode induzir respostas imunes capazes de proteger camundongos contra a colonização vaginal e desafio letal com GBS. Além disso, soros gerados contra BibA foram capazes de reconhecer diferentes sorotipos de GBS, fator importante devido à distribuição de sorotipos em todo o mundo. Nossos dados confirmam o potencial promissor de BibA para ser utilizado como antígeno em uma formulação de vacina usada para prevenir a colonização por GBS nas mães e, consequentemente, prevenir doenças de recém-nascidos.



## 6 CONCLUSÃO

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, nós encontramos alguns problemas relacionados à obtenção do antígeno Sip, não sendo possível obter a sua expressão em *B. subtilis*. Além disso, a proteína Sip expressa em cepas de *E. coli* não apresentou estabilidade suficiente para ser utilizada nos protocolos de imunização. O antígeno BibA foi purificado com sucesso a partir da expressão em *E. coli* BL21(DE3). A proteína apresentou-se enovelada, com alta estabilidade térmica e foi reconhecida por anticorpos anti-GBS.

Ambos os antígenos foram imunogênicos, induzindo soros policlonais antígeno-específicos em camundongos da linhagem Balb/c, capazes de reconhecer o GBS por meio de ensaios de ELISA e imunofluorescência. Além disso, o antígeno BibA foi capaz de induzir respostas imunológicas também em camundongos da linhagem C57BL/6, utilizados nos ensaios de desafio em modelo animal.

Foi possível padronizar os ensaios *in vitro* de morte por opsonofagocitose e invasão de células e epiteliais para avaliar a funcionalidade dos anticorpos gerados após imunização dos camundongos. A formulação vacinal BibA-LTK63R foi capaz de gerar soros capazes de melhorar a opsonização do GBS, aumentando os índices de morte por opsonofagocitose. Além disso, imunização com o antígeno BibA levou à redução da invasão de células epiteliais. Esses dados demonstram que soros gerados contra o antígeno recombinante foram capazes de gerar respostas imunológicas eficientes em bloquear passos importantes para o desenvolvimento da doença causada por GBS.

Também foi possível estabelecer os modelos animais para os desafios de colonização vaginal e desafio letal (DL<sub>80</sub>) com GBS em camundongos da linhagem C57BL/6. Os soros gerados contra o BibA foram capazes de proteger 80% dos camundongos da colonização vaginal e do desafio letal com o GBS-V. Em adição, esses soros foram capazes de promover proteção passiva a camundongos não imunizados frente a desafio de colonização vaginal.

Tomados em conjunto, esses resultados demonstraram que a imunização de camundongos com a adesina bacteriana imunogênica BibA recombinante do *Streptococcus* do grupo B aumentou a magnitude das respostas de anticorpos desencadeadas contra o GBS. Esses dados mostram que a rBibA é um antígeno forte para ser utilizado sozinho ou associado a outros antígenos proteicos em uma formulação vacinal contra diferentes sorotipos de GBS, contribuindo para prevenir a colonização e invasão, etapas necessárias para o desenvolvimento de doenças invasivas.

**REFERÊNCIAS**

ABARZÚA, F. et al. Prevalencia de portación vaginal-anal de *Streptococcus agalactiae* en el tercer trimestre de gestación y susceptibilidad a macrólidos y lincosamidas, en mujeres embarazadas de Clínica Alemana Temuco, Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 31, n. 3, p. 305–308, jun. 2014.

AL-SWEIH, N. et al. *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci) Carriage in Late Pregnancy in Kuwait. **Medical Principles and Practice**, v. 13, n. 1, p. 10–14, 2004.

AVCI, F. Y.; KASPER, D. L. How Bacterial Carbohydrates Influence the Adaptive Immune System. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 107–130, mar. 2010.

BADIEE, A. et al. The role of liposome size on the type of immune response induced in BALB/c mice against leishmaniasis: rgp63 as a model antigen. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 4, p. 403–409, dez. 2012.

BAKER, C. J. The spectrum of perinatal group B streptococcal disease. **Vaccine**, v. 31, p. D3–D6, ago. 2013.

BAKER, C. J. et al. Maternal Antibody at Delivery Protects Neonates From Early Onset Group B Streptococcal Disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 5, p. 781–788, 1 mar. 2014.

BAKER, C. J.; MARCIA, M. D.; RENCH, B. S. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B *Streptococcus*. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 18, p. 1180–1185, 1998.

BAKER, J. A. et al. Mucosal vaccination promotes clearance of *Streptococcus agalactiae* vaginal colonization. **Vaccine**, v. 35, n. 9, p. 1273–1280, mar. 2017.

BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1399–1408, nov. 2004.

BATISTA, M. T. et al. LT adjuvant modulates epitope specificity and improves the efficacy of murine antibodies elicited by sublingual vaccination with the N-terminal domain of *Streptococcus mutans* P1. **Vaccine**, v. 35, n. 52, p. 7273–7282, dez. 2017.

BAXTER, D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. **Occupational Medicine**, v. 57, n. 8, p. 552–556, 1 dez. 2007.

BECKMANN, C. et al. Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. **Infection and immunity**, v. 70, n. 6, p. 2869–76, jun. 2002.

BELARD, S. et al. *Streptococcus agalactiae* Serotype Distribution and Antimicrobial Susceptibility in Pregnant Women in Gabon, Central Africa. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p.

\*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

17281, dez. 2015.

BLACK, S. et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 19, n. 3, p. 187–195, mar. 2000.

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, 2016.

BOLDUC, G. R.; MADOFF, L. C. The group B streptococcal alpha C protein binds 1 1-integrin through a novel KTD motif that promotes internalization of GBS within human epithelial cells. **Microbiology**, v. 153, n. 12, p. 4039–4049, dez. 2007.

BORG, N. A. et al. CD1d–lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. **Nature**, v. 448, n. 7149, p. 44–49, 20 jul. 2007.

BORGES, S.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 3, p. 677–682, mar. 2012.

BOYER, K. M. et al. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. **The Journal of infectious diseases**, v. 148, n. 5, p. 802–9, nov. 1983.

BOYER, K. M.; GOTOFF, S. P. Prevention of Early-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease with Selective Intrapartum Chemoprophylaxis. **New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 26, p. 1665–1669, jun. 1986.

BRANDTZAEG, P. et al. Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 1, p. 31–37, jan. 2008.

BRIMIL, N. et al. Epidemiology of Streptococcus agalactiae colonization in Germany. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, n. 1, p. 39–44, fev. 2006.

BRODEUR, B. R. et al. Identification of group B streptococcal Sip protein, which elicits cross-protective immunity. **Infection and immunity**, v. 68, n. 10, p. 5610–8, out. 2000.

CAGNO, C. K.; PETTIT, J. M.; WEISS, B. D. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Updated CDC guideline. **American Family Physician**, v. 86, n. 1, p. 59–65, 2012.

CARLIN, A. F. et al. Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 8, p. 1691–1699, ago. 2009.

CDC. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, Group A Streptococcus, 2013. p. 2016, 2013.

CHEN, Q.; MOSOVSKY, K. L.; ROSS, A. C. Retinoic acid and  $\alpha$ -galactosylceramide regulate the expression of costimulatory receptors and transcription factors responsible for B

- cell activation and differentiation. **Immunobiology**, v. 218, n. 12, p. 1477–1487, dez. 2013.
- CHEN, V. L.; AVCI, F. Y.; KASPER, D. L. NIH Public Access. v. 31, n. 0 4, 2014.
- CHENG, Q. The Group B Streptococcal C5a Peptidase Is Both a Specific Protease and an Invasin. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2408–2413, maio 2002.
- CLARK, E. D. B. Protein refolding for industrial processes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 202–207, abr. 2001.
- CORTHÉSY, B. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, n. 6, p. 661–665, abr. 2013.
- CURRIE, A. J. et al. Preterm Infants Have Deficient Monocyte and Lymphocyte Cytokine Responses to Group B Streptococcus. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 4, p. 1588–1596, abr. 2011.
- D'URZO, N. et al. Acidic pH strongly enhances in vitro biofilm formation by a subset of hypervirulent ST-17 Streptococcus agalactiae strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 7, p. 2176–2185, 2014.
- DA HORA, V. P. et al. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v. 29, n. 8, p. 1538–1544, fev. 2011.
- DAGNEW, A. F. et al. Variation in Reported Neonatal Group B Streptococcal Disease Incidence in Developing Countries. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 1, p. 91–102, jul. 2012.
- DAUBY, N. et al. Increased Risk of Group B Streptococcus Invasive Infection in HIV-Exposed but Uninfected Infants: A Review of the Evidence and Possible Mechanisms. **Frontiers in Immunology**, v. 7, nov. 2016.
- DE MAGISTRIS, M. T. et al. Adjuvant effect of non-toxic mutants of E. coli heat-labile enterotoxin following intranasal, oral and intravaginal immunization. **Developments in biological standardization**, v. 92, p. 123–6, 1998.
- DE SOUZA, R. D. et al. Bacillus subtilis Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e87454, 27 jan. 2014.
- DEMAGISTRIS, M. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 1, p. 52–67, abr. 2006.
- DURÁN, V. et al. Preferential uptake of chitosan-coated PLGA nanoparticles by primary human antigen presenting cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 21, p. 102073, out. 2019.
- DUTRA, V. G. et al. Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. p. 1–9, 2014.
- EDMOND, K. M. et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months:

- systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 379, n. 9815, p. 547–556, fev. 2012.
- FALLON, R. J. The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic streptococci. **Journal of Clinical Pathology**, v. 27, n. 11, p. 902–905, 1 nov. 1974.
- FIŠER, J. et al. ODKRIVANJE KOLONIZACIJE NOSEČNIC Z BAKTERIJO. Streptococcus Agalactiae V Severnoprimerški Regiji Detection Of Colonization Of Pregnant Women With Streptococcus. **ZDRAV VESTN**, v. 70, p. 623–626, 2001.
- FLAHERTY, R. A. et al. Genetically distinct Group B Streptococcus strains induce varying macrophage cytokine responses. **PLOS ONE**, v. 14, n. 9, p. e0222910, 19 set. 2019.
- FLUEGGE, K. et al. Identification and immunoreactivity of proteins released from Streptococcus agalactiae. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, n. 11, p. 818–824, nov. 2004.
- FORTHAL, D. N. Functions of Antibodies. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 4, p. 1–17, 2014.
- GILL, P. No Title Nanocarriers, nanovaccines, and nanobacteria as nanobiotechnological concerns in modern vaccines. **Scientia Iranica**, v. 20, n. 3, p. 1003–1013, 2013.
- GLEZEN, W. P.; ALPERS, M. Maternal Immunization. **Clinical Infectious Diseases**, v. 28, n. 2, p. 219–224, fev. 1999.
- GOMEZ-LOPEZ, N. et al. Amniotic fluid neutrophils can phagocytize bacteria: A mechanism for microbial killing in the amniotic cavity. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 78, n. 4, p. 1–16, 2017.
- GRAVEKAMP, C. et al. Alpha C protein as a carrier for type III capsular polysaccharide and as a protective protein in group B streptococcal vaccines. **Infection and immunity**, v. 67, n. 5, p. 2491–6, maio 1999.
- GRIMWOOD, K. et al. Late antenatal carriage of group B Streptococcus by New Zealand women. **The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology**, v. 42, n. 2, p. 182–6, maio 2002.
- GUPALOVA, T. et al. Development of experimental GBS vaccine for mucosal immunization. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0196564, 4 maio 2018.
- GUTTORMSEN, H.-K.; LIU, Y.; PAOLETTI, L. C. Functional activity of antisera to group B streptococcal conjugate vaccines measured with an opsonophagocytosis assay and HL-60 effector cells. **Human Vaccines**, v. 4, n. 5, p. 370–374, 27 set. 2008.
- HAKENBECK, R. et al. beta-lactam resistance in Streptococcus pneumoniae: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. **Molecular microbiology**, v. 33, n. 4, p. 673–8, ago. 1999.
- HANSEN, S. M. et al. 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, jan. 2004.

HAYS, C. et al. Changing epidemiology of Group B Streptococcus susceptibility to fluoroquinolones and aminoglycosides in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. AAC.01374-16, out. 2016.

HEATH, P. T. Status of vaccine research and development of vaccines for GBS. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2876–2879, 2016.

HEATH, P. T.; SCHUCHAT, A. Perinatal group B streptococcal disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 21, n. 3, p. 411–424, jun. 2007.

HENNEKE, P.; BERNER, R. Interaction of Neonatal Phagocytes with Group B Streptococcus: Recognition and Response. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3085–3095, jun. 2006.

HIGH, K. P.; EDWARDS, M. S.; BAKER, C. J. Group B Streptococcal Infections in Elderly Adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 6, p. 839–847, set. 2005.

HILL, A. B. et al. Improving global vaccine accessibility. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 67–73, dez. 2016.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nature Medicine**, v. 11, n. S4, p. S45–S53, 5 abr. 2005.

HUANG, J.-M. et al. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. **Vaccine**, v. 28, n. 4, p. 1021–1030, jan. 2010.

JAUNEIKAITĖ, E. et al. Serial Clustering of Late-Onset Group B Streptococcal Infections in the Neonatal Unit: A Genomic Re-evaluation of Causality. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 6, p. 854–860, 31 ago. 2018.

JOHRI, A. K. et al. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 932–942, dez. 2006.

JORDAN, H. T. et al. Revisiting the Need for Vaccine Prevention of Late-Onset Neonatal Group B Streptococcal Disease. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. 12, p. 1057–1064, dez. 2008.

KAPATAI, G. et al. Comparison of molecular serotyping approaches of Streptococcus agalactiae from genomic sequences. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 429, dez. 2017.

KASPER, D. L. et al. Immune response to type III group B streptococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 10, p. 2308–2314, nov. 1996.

KELLER, M. A.; STIEHM, E. R. Passive Immunity in Prevention and Treatment of Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 602–614, 1 out. 2000.

KIM, S.-Y. et al. Cost-effectiveness of a potential group B streptococcal vaccine for pregnant

women in the United States. **Vaccine**, v. 35, n. 45, p. 6238–6247, out. 2017.

KIMURA, K. et al. First Molecular Characterization of Group B Streptococci with Reduced Penicillin Susceptibility. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2890–2897, ago. 2008.

KO, S.-Y. et al. alpha-Galactosylceramide can act as a nasal vaccine adjuvant inducing protective immune responses against viral infection and tumor. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 175, n. 5, p. 3309–17, 1 set. 2005.

KOLTER, J.; HENNEKE, P. Codevelopment of microbiota and innate immunity and the risk for group B streptococcal disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 1–13, 2017.

KONTO-GHIORGHI, Y. et al. Dual Role for Pilus in Adherence to Epithelial Cells and Biofilm Formation in Streptococcus agalactiae. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, p. e1000422, maio 2009.

KWATRA, G. et al. Prevalence of maternal colonisation with group B streptococcus: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1076–1084, set. 2016.

LANCEFIELD, B. Y. R. C.; HARE, R. The Serological Differentiation Of Pathogenic And Non-Pathogenic Strains Of Hemolytic Streptococci From Parturient Women. **J Exp Med.**, v. 28;61(3):3, 1935.

LANCEFIELD, R. Two Serological Types Of Group B Hemolytic Streptococci With Related, But Not Identical, Type-Specific Substances. **J Exp Med.**, v. 1;67(1):25, 1938.

LANDWEHR-KENZEL, S.; HENNEKE, P. Interaction of Streptococcus agalactiae and cellular innate immunity in colonization and disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–11, 2014.

LARSSON, C. et al. Intranasal immunization of mice with group B streptococcal protein rib and cholera toxin B subunit confers protection against lethal infection. **Infection and immunity**, v. 72, n. 2, p. 1184–7, fev. 2004.

LE DOARE, K. et al. Association between functional antibody against Group B Streptococcus and maternal and infant colonization in a Gambian cohort. **Vaccine**, v. 35, n. 22, p. 2970–2978, 2017.

LEFEBER, D. J. et al. Th1-Directing Adjuvants Increase the Immunogenicity of Oligosaccharide-Protein Conjugate Vaccines Related to Streptococcus pneumoniae Type 3. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 12, p. 6915–6920, 1 dez. 2003.

LEVINE, M. M.; DOUGAN, G. Optimism over vaccines administered via mucosal surfaces. **The Lancet**, v. 351, n. 9113, p. 1375–1376, maio 1998.

LIBSTER, R. et al. Long-term Outcomes of Group B Streptococcal Meningitis. **PEDIATRICS**, v. 130, n. 1, p. e8–e15, 1 jul. 2012.

- 
- LIOVIC, M. et al. Inclusion bodies as potential vehicles for recombinant protein delivery into epithelial cells. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 67, 2012.
- LOO, C. Y.; CORLISS, D. a; GANESHKUMAR, N. Streptococcus gordonii Biofilm Formation : Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes Streptococcus gordonii Biofilm Formation : Identification of Genes that Code for Biofilm Phenotypes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1374–1382, 2000.
- LU, B. et al. Epidemiology of Group B streptococcus isolated from pregnant women in Beijing, China. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 6, p. O370–O373, jun. 2014.
- LYCKE, N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. **Nature reviews. Immunology**, v. 12, n. 8, p. 592–605, 25 jul. 2012.
- MADHI, S. A. et al. High burden of invasive Streptococcus agalactiae disease in South African infants. **Annals of Tropical Paediatrics**, v. 23, n. 1, p. 15–23, mar. 2003.
- MADHI, S. A. et al. Considerations for a phase-III trial to evaluate a group B Streptococcus polysaccharide-protein conjugate vaccine in pregnant women for the prevention of early- and late-onset invasive disease in young-infants. **Vaccine**, v. 31, p. D52–D57, ago. 2013.
- MADRID, L. et al. Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. suppl\_2, p. S160–S172, 6 nov. 2017.
- MAEDA, D. L. N. F. et al. Adjuvant-Mediated Epitope Specificity and Enhanced Neutralizing Activity of Antibodies Targeting Dengue Virus Envelope Protein. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 25 set. 2017.
- MAIONE, D. Identification of a Universal Group B Streptococcus Vaccine by Multiple Genome Screen. **Science**, v. 309, n. 5731, p. 148–150, jul. 2005.
- MAISEY, H. C.; DORAN, K. S.; NIZET, V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 10, p. e27, 22 set. 2008.
- MARSHALL, J. S. et al. An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, v. 14, n. S2, p. 49, 12 set. 2018.
- MARTIN, D. et al. Protection from group B streptococcal infection in neonatal mice by maternal immunization with recombinant Sip protein. **Infection and immunity**, v. 70, n. 9, p. 4897–901, set. 2002.
- MARUVADA, R.; PRASADARAO, N. V.; RUBENS, C. E. Acquisition of factor H by a novel surface protein on group B Streptococcus promotes complement degradation. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 11, p. 3967–3977, nov. 2009.
- MATSUBARA, K.; HOSHINA, K.; SUZUKI, Y. Early-onset and late-onset group B streptococcal disease in Japan: a nationwide surveillance study, 2004–2010. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. e379–e384, jun. 2013.



- MCGHEE, J. R.; FUJIHASHI, K. Inside the Mucosal Immune System. **PLoS Biology**, v. 10, n. 9, p. e1001397, 25 set. 2012.
- MEEUSEN, E. N. Exploiting mucosal surfaces for the development of mucosal vaccines. **Vaccine**, v. 29, n. 47, p. 8506–8511, 2011.
- MOORE, M. R.; SCHRAG, S. J.; SCHUCHAT, A. Effects of intrapartum antimicrobial prophylaxis for prevention of group-B-streptococcal disease on the incidence and ecology of early-onset neonatal sepsis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 3, n. 4, p. 201–13, abr. 2003.
- MUNOZ, F. M. et al. Safety and Immunogenicity of Tetanus Diphtheria and Acellular Pertussis (Tdap) Immunization During Pregnancy in Mothers and Infants. **JAMA**, v. 311, n. 17, p. 1760, 7 maio 2014.
- NANDEDKAR, T. D. Nanovaccines: recent developments in vaccination. **Journal of Biosciences**, v. 34, n. 6, p. 995–1003, 4 dez. 2009.
- NUCCITELLI, A. et al. Structure-based approach to rationally design a chimeric protein for an effective vaccine against Group B Streptococcus infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 25, p. 10278–10283, jun. 2011.
- NUCCITELLI, A.; RINAUDO, C. D.; MAIONE, D. Group B *Streptococcus* vaccine: state of the art. **Therapeutic Advances in Vaccines**, v. 3, n. 3, p. 76–90, 2015.
- PAOLETTI, L. C. et al. Effects of Alum Adjuvant or a Booster Dose on Immunogenicity during Clinical Trials of Group B Streptococcal Type III Conjugate Vaccines. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6696–6701, nov. 2001.
- PAOLETTI, L. C.; KASPER, D. L. Conjugate Vaccines against Group B Streptococcus Types IV and VII. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 1, p. 123–126, jul. 2002.
- PATI, R.; SHEVTSOV, M.; SONAWANE, A. Nanoparticle Vaccines Against Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 4 out. 2018.
- PATRAS, K. A. et al. Characterization of host immunity during persistent vaginal colonization by Group B Streptococcus. **Mucosal Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1339–1348, nov. 2015.
- PEDERSEN, G.; COX, R. The mucosal vaccine quandary: Intranasal vs. sublingual immunization against influenza. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 8, n. 5, p. 689–693, maio 2012.
- PEREIRA, U. P. et al. In silico prediction of conserved vaccine targets in Streptococcus agalactiae strains isolated from fish, cattle, and human samples. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2902–2912, 2013.
- PHARES, C. R. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in the United States, 1999-2005. **JAMA**, v. 299, n. 17, p. 2056, maio 2008.

- 
- PLOTKIN, S. A. Correlates of Protection Induced by Vaccination. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 7, p. 1055–1065, 2010.
- PROENCA-MODENA, J. L. et al. High Rates of Detection of Respiratory Viruses in Tonsillar Tissues from Children with Chronic Adenotonsillar Disease. v. 7, n. 8, 2012.
- RAGUNATHAN, P.; PONNURAJ, K. Expression, Purification and Structural Analysis of a Fibrinogen Receptor FbsA from *Streptococcus agalactiae*. **The Protein Journal**, v. 30, n. 3, p. 159–166, mar. 2011.
- RAHIMIAN, S. et al. Polymeric nanoparticles for co-delivery of synthetic long peptide antigen and poly IC as therapeutic cancer vaccine formulation. **Journal of Controlled Release**, v. 203, p. 16–22, abr. 2015.
- RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. **Future Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 201–221, mar. 2009.
- RANABIR, P.; DECHEN, T.; SUMIT, K. Correlates of vaginal colonization with group B streptococci among pregnant women. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 236, 2010.
- REINSCHEID, D. J. et al. Identification and Molecular Analysis of PcsB, a Protein Required for Cell Wall Separation of Group B Streptococcus. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1175–1183, fev. 2001.
- RINAUDO, C. D. et al. Specific Involvement of Pilus Type 2a in Biofilm Formation in Group B Streptococcus. **PLoS ONE**, v. 5, n. 2, p. e9216, fev. 2010.
- RIOUX, S. et al. Localization of Surface Immunogenic Protein on Group B Streptococcus. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 5162–5165, 2001.
- ROBERTS, J. N.; GRUBER, M. F. Regulatory considerations in the clinical development of vaccines indicated for use during pregnancy. **Vaccine**, v. 33, n. 8, p. 966–972, fev. 2015.
- ROMERO-STEINER, S. et al. Use of Opsonophagocytosis for Serological Evaluation of Pneumococcal Vaccines. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 2, p. 165–169, 1 fev. 2006.
- RUSSELL, L. B. et al. Cost-effectiveness of maternal GBS immunization in low-income sub-Saharan Africa. **Vaccine**, v. 35, n. 49, p. 6905–6914, dez. 2017a.
- RUSSELL, N. J. et al. Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 65, n. suppl\_2, p. S100–S111, nov. 2017b.
- RYAN, E. J. et al. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin act as effective mucosal adjuvants for nasal delivery of an acellular pertussis vaccine: differential effects of the nontoxic AB complex and enzyme activity on Th1 and Th2 cells. **Infection and immunity**, v.

67, n. 12, p. 6270–80, dez. 1999.

SAHA, S. K. et al. Group B Streptococcus among Pregnant Women and Newborns in Mirzapur, Bangladesh: Colonization, Vertical Transmission, and Serotype Distribution. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2406–2412, ago. 2017.

SAHDEV, P.; OCHYL, L. J.; MOON, J. J. Biomaterials for Nanoparticle Vaccine Delivery Systems. **Pharmaceutical Research**, v. 31, n. 10, p. 2563–2582, 22 out. 2014.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed ed. New York: Laboratory Press, 2001.

SANTI, I. et al. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B Streptococcus survival in human blood. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 3, fev. 2007.

SANTI, I. et al. BibA Induces Opsonizing Antibodies Conferring In Vivo Protection against Group B Streptococcus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 4, p. 564–570, ago. 2009a.

SANTI, I. et al. CsrRS Regulates Group B Streptococcus Virulence Gene Expression in Response to Environmental pH: a New Perspective on Vaccine Development. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 17, p. 5387–5397, set. 2009b.

SCHORNER, M. A. Detection of Group B Streptococcus agalactiae from Anorectal and Vaginal Screening Tests. **Clinical Microbiology: Open Access**, v. 03, n. 05, 2014.

SCHRAG, S. et al. Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. **MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports**, v. 51, n. RR-11, p. 1–22, ago. 2002.

SCHUCHAT, A. Epidemiology of Group B Streptococcal Disease in the United States: Shifting Paradigms. v. 11, n. 3, p. 497–513, 1998.

SCHUCHAT, A. Group B streptococcus. **The Lancet**, v. 353, n. 9146, p. 51–56, jan. 1999.

SEO, H. S. et al. Characterization of Fibrinogen Binding by Glycoproteins Srr1 and Srr2 of Streptococcus agalactiae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 50, p. 35982–35996, dez. 2013.

SHABAYEK, S.; SPELLERBERG, B. Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 14 mar. 2018.

SHET, A.; FERRIERI, P. Neonatal & maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. **The Indian journal of medical research**, v. 120, n. 3, p. 141–50, set. 2004.

SINGH, N. et al. Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 163, n. 5, p. 2373–7, 1 set. 1999.

- SKOFF, T. H. et al. Increasing Burden of Invasive Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults, 1990–2007. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 1, p. 85–92, jul. 2009.
- SLOTVED, H.-C. et al. Serotype IX, a Proposed New Streptococcus agalactiae Serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2929–2936, set. 2007.
- SONG, J. Y. et al. Progress toward a group B streptococcal vaccine. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, p. 1–13, 11 jul. 2018.
- STUPAK, A. et al. The colonization of the women genital tract by Streptococcus agalactiae. **Archives of Perinatal Medicine**, v. 16, n. 1, p. 48–50, 2010.
- TAVARES, M. B. et al. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of Streptococcus mutans P1 protein produced by a recombinant Bacillus subtilis strain. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 131–142, jul. 2010.
- VAN DER MEE-MARQUET, N. et al. Molecular Characterization of Human-Colonizing Streptococcus agalactiae Strains Isolated from Throat, Skin, Anal Margin, and Genital Body Sites. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 2906–2911, set. 2008.
- VEKEMANS, J. et al. Maternal immunization against Group B streptococcus: World Health Organization research and development technological roadmap and preferred product characteristics. **Vaccine**, v. 37, n. 50, p. 7391–7393, nov. 2019.
- VERANI, J. R.; SCHRAG, S. J. Group B Streptococcal Disease in Infants: Progress in Prevention and Continued Challenges. **Clinics in Perinatology**, v. 37, n. 2, p. 375–392, jun. 2010.
- VORNHAGEN, J. et al. Group B streptococcus exploits vaginal epithelial exfoliation for ascending infection. **Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 5, p. 1985–1999, 1 maio 2018.
- VORNHAGEN, J.; ADAMS WALDORF, K. M.; RAJAGOPAL, L. Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity, and Prevention Strategies. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 11, p. 919–931, nov. 2017.
- WALLIS, J.; SHENTON, D. P.; CARLISLE, R. C. Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies. **Clinical & Experimental Immunology**, p. cei.13287, 8 abr. 2019.
- WILCOX, C. R.; HOLDER, B.; JONES, C. E. Factors Affecting the FcRn-Mediated Transplacental Transfer of Antibodies and Implications for Vaccination in Pregnancy. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 13 out. 2017.
- WOODROW, K. A.; BENNETT, K. M.; LO, D. D. Mucosal Vaccine Design and Delivery. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 14, n. 1, p. 17–46, ago. 2012.
- XUE, G. et al. Intranasal immunization with GBS surface protein Sip and ScpB induces

specific mucosal and systemic immune responses in mice. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 202–210, mar. 2010.

ZIMMERMANN, P.; GWEE, A.; CURTIS, N. The controversial role of breast milk in GBS late-onset disease. **Journal of Infection**, v. 74, p. S34–S40, jun. 2017.

## APÊNDICE

### **Participação em cursos e eventos científicos**

- a) FEBRACE - 14ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia - Comissão de Avaliação (2016)
- b) Minicurso CRISPRCas9 - System for genome editing in bacteria - USP (2016)
- c) V Semana de Inovações Biológicas e Biotecnológicas Aplicadas à Saúde - SIBBAS (2017)
- d) I Workshop in Microbial Molecular Biology (2017)
- e) FEBRACE - 16ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia - Comissão de Avaliação (2018)
- f) Congresso Brasileiro de Biotecnologia – participação e apresentação de pôster (2018)
- g) Workshop Redação de Patentes (2018)
- h) Congresso Brasileiro de Microbiologia – apresentação de pôster (2019)

### **Atividades acadêmicas**

- a) PAE - Disciplina de Bacteriologia (2º sem/2016)
- b) PAE - Disciplina de Microbiologia aplicada para Engenheiros ambientais (1º sem/2017)
- c) PAE – Disciplina de Biologia Molecular I (2º sem/2017)
- f) Monitoria - IV Curso de Inverno em Microbiologia e Biologia Molecular Aplicada (2017)
- d) PAE – Disciplina de Microbiologia (1º sem/2018)
- e) Monitoria - Módulo de Bacteriologia Especialização da SBM (2017 e 2018)

### **Intercâmbio**

Estágio de um ano (2019-2020), na University of Virginia, departamento de Fisiologia Molecular e Física Biológica, sob orientação do Prof. Dr. Owen Pornillos.

### **Publicações**

Artigo submetido à Vaccine Journal: “Immunization with recombinant BibA surface protein confers immunity and protects mice against group B Streptococcus (GBS) vaginal colonization”. Autores: Nayara F. B. dos Santos; Lukas R da Silva; Fagner J. M. D. Costa; Daniely M de Mattos; Enéas de Carvalho; Luís C. S. Ferreira; Rita de C. C. Ferreira.

DO NASCIMENTO CS, DOS SANTOS NFB, FERREIRA RCC, TADDEI CR. Streptococcus agalactiae in pregnant women in Brazil: prevalence, serotypes, and antibiotic resistance. **Braz J Microbiol.** 2019 Oct;50(4):943-952. doi: 10.1007/s42770-019-00129-8. Epub 2019 Aug 20.