

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Polissacarídeo capsular do *Streptococcus agalactiae* como antígeno
vacinal: desenvolvimento de um modelo vacinal para mucosas com
Nanopartícula de quitosana

Sibylle Sophie Hacker

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

SÃO PAULO

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Polissacarídeo capsular do *Streptococcus agalactiae* como antígeno
vacinal: desenvolvimento de um modelo vacinal para mucosas com
Nanopartícula de quitosana

Sibylle Sophie Hacker

Versão original

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Stephano

SÃO PAULO
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Bibliotecas e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Hacker, Sibylle Sophie

H118 Polissacarídeo capsular do *Streptococcus agalactiae* como antígeno vacinal: desenvolvimento de um modelo vacinal para mucosas com Nanopartícula de quitosana / Sibylle Sophie Hacker. -- São Paulo, 2018. 130p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Stephano, Marco Antônio

1. Antígeno bacteriano: Imunologia 2. Vacina I. T. II. Stephano, Marco Antônio.

616.92079 CDD

Sibylle Sophie Hacker

Polissacarídeo capsular do *Streptococcus agalactiae* como antígeno
vacinal: desenvolvimento de um modelo vacinal para mucosas com
Nanopartícula de quitosana

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Marco Antônio Stephano
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018

DEDICATÓRIA

Eu dedico, em primeiro lugar, a **DEUS e a todos abaixo** – que Ele me abençoou para estarem juntos comigo.

Minhas amadas filhas (Sophie A. Hacker Lago e Louise Y. Hacker Lago) que são a razão da minha vida e as flores que crescem no meu coração. Fazem-me sorrir e continuar a lutar por elas sempre. Amo vocês! Muito!

Meu amado Carlos A. Casagrande, quem me ensinou o significado real do Amor, Companheirismo, Amizade, Diversão e Razão de continuar a seguir e sorrir juntos.

Meus amados pais (Felix B. Hacker e Nilza M. Hacker) que sempre me incentivaram nos estudos e que me apoiam sempre. Eterna gratidão e Amor!

A minha amada irmã gêmea Sylvia L. Hacker, presente em todas as etapas da minha vida. Amo-te muito, sempre me ajuda com nossos *brainstorming* a alcançar voos maiores.

Meus amados irmãos (Felix C. Hacker e Undine B. Hacker), meus cunhados (Carla C. Hacker, Peter Koralus e Gean M. Furlan) e meus sobrinhos Heiner C. Hacker, Julia C. Hacker, Johann W. Hacker Poetscher, Erich S. Hacker Poetscher e Christian F. Hacker Koralus.

Também dedico ao Paulinho Stephano, filho do meu orientador, Professor Dr. Marco Antônio Stephano, que foi a grande inspiração para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS** por ter colocado todos **os Anjos abaixo**, que sem eles não teria sido possível o término deste projeto.

Ao meu orientador, **Professor Dr. Marco Antônio Stephano**, pela orientação constante e presença em todas as etapas deste projeto. Pela oportunidade do doutorado, por sempre ter acreditado no meu potencial e no meu conhecimento, por sempre “ensinar a pescar” e por realmente me possibilitar ser uma profissional melhor.

Ao **Dr. Paulo Soares** e ao **Professor Dr. Paulo Mourão**, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que colaboraram na purificação e elucidação da estrutura do polissacarídeo.

A **meus queridos colegas de Pós Graduação** que em todas as etapas do projeto em ajudaram com orientações, discussões e amizade: Magali T. Uono (pela contribuição e ajuda impagável nas técnicas laboratoriais), Laura Freitas de Andrade (orientação de como fazer as Nanopartículas), Natália Marchesan (contribuição na liofilização e Nanopartículas), Camila H. Chiba (pelas inúmeras contribuições no laboratório e no teste ELISA), Andreia C. Parra (pela ajuda nos testes de BCA e eletroforese), Taís Mayumi Kuniyoshi (pela contribuição do teste genômico 16S), Ignacio Moguel e Juan Carlos Flores Santos (pelas valiosas orientações na fermentação), Prof. Dr. Adalberto Pessoa (sempre prestativo em seu laboratório), Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira (pelo uso do laboratório), Prof. Dr Luis Carlos Ferreira e Milena A. Santos (que conduziram comigo os primeiros experimentos com GBS no ICB), Bruna Fernandes, pelo apoio e risadas, Richard S. Gonzales e Katherine Curo Melo, pela amizade Aos técnicos

Alexandre e Nilton, por serem sempre colaborativos e prestativos quando precisei. Às secretárias da pós-graduação: Rose, Tânia, Elza, Sueli e Irineu, pelo carinho que sempre me trataram e competência em resolver todos os problemas quando surgiam. À Roseli Stephano, que ajudou na imunização.

À **Flavia de M. Prates Ong**, do Biotério da FÁrmacia, que pacientemente explicou todos os procedimentos com os camundongos e sempre estava prestativa em ajudar.

Ao **Jorge de Lima** e ao **André Rovegno**, que leram atentamente meu trabalho e me deram contribuições valiosas.

Ao **Prof. Dr. Klaus Langer** da Universidade de Münster, pela oportunidade de ficar em seu laboratório na Alemanha e aprender muito sobre nanopartículas.

Ao Laboratório de Física Aplicada da Universidade de São Paulo, com **Dr. Antônio Carlos Franco da Silveira**, que pacientemente conduziu os testes de difração de Raio-X e se tornou um querido amigo.

Ao Laboratório de Microrreologia e Fisiologia Molecular - Instituto de Física, do **Dr. Antônio Carlos Bloise**, da Universidade de São Paulo, pelos estudos de NMR e conselhos valorosos.

Ao professor **Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio**, do Laboratório Laboratório de Microbiologia Clínica no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, pela contribuição no teste MALDI-TOF

À professora **Dra. Iolanda M. Cuccovia** e ao **pesquisador Gustavo P. B. Carretero**, do Instituto de Química da USP, pelo uso do DLS e pela orientação do método fenol sulfúrico.

Aos membros da minha **Banca de Qualificação: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro, Prof. Dr. Sandro de Almeida e Dra. Patricia De Aniz**, que leram atentamente o projeto e deram sugestões valiosas para a continuação do mesmo. E aos membros da comissão julgadora para obtenção de título.

E, novamente, o **Prof. Dr. Marco Antônio Stephano**, pela dedicação e paciência de ser um mestre e orientador de todo este processo.

E, por fim, meus **camundongos fêmeas**, que com seus olhos humildes nos falaram da sua vontade de viver; aqueles animais, vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humanidade. **O nosso respeito e eterna gratidão.**

Se o papel do professor é fazer com que nasça o desejo de aprender,
sua tarefa é “criar o enigma” ou, mais exatamente,
fazer do saber um enigma: comentá-lo ou mostrá-lo suficientemente para que se
entrevejam seu interesse e sua riqueza,
mas calar-se a tempo para suscitar a vontade de desvendá-lo

MEIRIEU, 1998

E um homem disse: "**Fala-nos do conhecimento de si próprio.**"

E ele respondeu, dizendo:

"Vosso coração conhece em silêncio os segredos dos dias e das noites;
Mas vossos ouvidos anseiam por ouvir o que vosso coração sabe.
Desejais conhecer em palavras aquilo que sempre conhecestes em pensamento.

Quereis tocar com os dedos o corpo nu de vossos sonhos.

E é bom que o desejeis.

A nascente secreta de vossa alma precisa brotar e correr, murmurando para o mar;

E o tesouro de vossas profundezas ilimitadas precisa revelar-se a vossos olhos.

Mas não useis balanças para pesar vossos tesouros desconhecidos;

E não procureis explorar as profundidades de vosso conhecimento com uma vara ou uma sonda,

Porque o Eu é um mar sem limites e sem medidas.

Não digais: "encontrei a verdade." Dizei de preferência "Encontrei uma verdade."

Não digais: "Encontrei o caminho da alma." Dizei de preferência: "Encontrei a alma andando em meu caminho."

Porque a alma anda por todos os caminhos.

A alma não marcha em linha reta nem cresce como um junco.

A alma desabrocha, qual um lótus de inúmeras pétalas."

Então, um professor disse: "**Fala-nos do ensino.**"

E ele respondeu, dizendo:

"Homem algum poderá revelar-vos senão o que já está meio adormecido
na aurora do vosso entendimento.

O mestre que caminha à sombra do templo, rodeado de discípulos,
não dá de sua sabedoria,
mas sim de sua fé e de sua ternura.

Se ele for verdadeiramente sábio, não vos convidará a entrar na mansão de seu saber,
mas vos conduzirá antes ao limiar de vossa própria mente.

O astrônomo poderá falar-vos de sua compreensão do espaço,
mas não vos poderá dar a sua compreensão.

O músico poderá cantar para vós o ritmo que existe em todo o universo,
mas não vos poderá dar o ouvido que capta a melodia,
nem a voz que a repete.

E o versado na ciência dos números poderá falar-vos do mundo dos pesos e das medidas,
mas não vos poderá levar até lá.

Porque a visão de um homem não empresta suas asas a outro homem.

E assim como cada um de vós se mantém isolado na consciência de Deus,
assim cada um deve ter sua própria compreensão de Deus
e sua própria interpretação das coisas da terra."

Por **Gibran Khalil Gibran**

"O profeta"

RESUMO

HACKER, S. S. **Polissacarídeo capsular do *Streptococcus agalactiae* como antígeno vacinal: desenvolvimento de um modelo vacinal para mucosas com Nanopartícula de quitosana.** 2018. 134f. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A bactéria gram-positiva *Streptococcus agalactiae* do grupo B (GBS) faz parte da microbiota normal do trato geniturinário humano, sendo um organismo comensal do corpo da mulher. No entanto, em mulheres grávidas, quando há alterações na composição microbiana do canal vaginal, pode ocorrer a proliferação e a infecção pelo GBS. Este microrganismo, em sua forma patogênica oportunista, pode infectar o neonato durante o parto natural, assim como contribuir para infecções urinárias e uterinas durante a gestação. O GBS já foi identificado como um dos responsáveis pela alta taxa de mortalidade neonatal, sendo um dos principais agentes de infecção em recém-nascidos no mundo. Ele também pode ser a causa de infecções nas gestantes, levando a várias complicações, como corioamnionite, endometrite e infecções do trato urinário e do sítio cirúrgico. Pode haver comprometimento da gestação e do feto, com abortamento, morte fetal intrauterina e ruptura da membrana coriônica, levando a parto prematuro – que pode resultar em outras consequências graves.

Este trabalho foi desenvolver um modelo vacinal para mucosa sublingual, utilizando o polissacarídeo capsular do *Streptococcus agalactiae* como antígeno, encapsulado em Nanopartículas de quitosana. Para o estudo de otimização dos parâmetros de fermentação, para aumentar a produtividade de cápsula polissacarídica (PS) presente na superfície celular, utilizou-se o Banco de Dados Kegg (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). A adição do suplemento L-Prolina foi o que propiciou a princípio, maior relação entre crescimento bacteriano e formação de cápsula polissacarídica. A purificação e extração da cápsula polissacarídica foi realizada com etapas sucessivas de ultra filtração tangencial e precipitação alcóolica dos contaminantes. As caracterizações físico-químicas: difração de raios-X (DRX), cromatografia gasosa (CGMS), ressonância magnética (NMR) e determinação de açúcares pelo método fenol-sulfúrico, foram realizadas para identificação da composição e estrutura monossacarídica de açúcares. O PS isolado apresenta ramificações de fucose, manose, glicose, galactose e N-acetil-glucosamina, apresentando estrutura amorfa. A liofilização do polissacarídeo foi realizada para fins de concentração e conservação. A encapsulação do polissacarídeo acoplada quimicamente com OVA, em uma Nanopartícula de quitosana, teve como finalidade aumentar a mucoadesividade e possibilitar maior absorção do antígeno entre as células da junção epitelial das mucosas sublinguais. A partir da análise de DLS (Espalhamento dinâmico de luz), as Nanopartículas apresentaram dimensões entre 200 a 400 nm e o Potencial Zeta acima de 20. O índice de polidispersão (PDI) está dentro do esperado (abaixo de 0.3). A capacidade de encapsulamento em relação à OVA foi de 92,8% dos grupos que continham PS. O teste IgG sérica total mostrou que o grupo G2 (Nanopartícula com Polissacarídeo e Proteína acoplados) foi o que teve maior reatividade no teste de ELISA, pela Análise de Variância (ANOVA) com ferramenta de Bonferrone. O teste sIgA mostrou que o grupo G2 (Nanopartícula com Polissacarídeo e Proteína acoplados) foi o que teve maior concentração de anticorpo sIgA total. Como resultado e conclusão, o polissacarídeo capsular do *Streptococcus agalactiae* é um bom candidato a antígeno vacinal.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*, vacina, polissacarídeo, imunização via mucosa sublingual, Nanopartícula.

SUMMARY

HACKER, S. S. **Capsular polysaccharide of *Streptococcus agalactiae* as vaccine antigen: development of a mucosal vaccine model with chitosan nanoparticle**. 2018. 134f. PhD Thesis - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Gram-positive bacteria *Streptococcus agalactiae* group B (GBS) is part of the normal microbiota of the human genitourinary tract, being a commensal organism of the female body. However, in pregnant women, when there are changes in the microbial composition of the vaginal canal, GBS proliferation and infection may occur. This microorganism, in its opportunistic pathogenic form, can infect the neonate during natural childbirth, as well as contribute to urinary and uterine infections during pregnancy. The GBS has already been identified as one of the responsible for the high neonatal mortality rate, being one of the main agents of infection in newborns in the world. It can also be the cause of infections in pregnant women, leading to various complications such as chorioamnionitis, endometritis, and urinary tract and surgical site infections. There may be pregnancy and fetal impairment, with abortion, fetal intrauterine death, and rupture of the chorionic membrane, leading to premature labor - which can result in other serious consequences.

This work was to develop a vaccine model for sublingual mucosa using the capsular polysaccharide of *Streptococcus agalactiae* as antigen, encapsulated in chitosan nano particles. For the study of optimization of the fermentation parameters, the Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) database was used to increase the productivity of polysaccharide capsule (PS) present on the cell surface. The addition of the L-Proline supplement gave rise to a higher ratio between bacterial growth and polysaccharide capsule formation. The purification and extraction of the polysaccharide capsule was performed with successive stages of tangential ultrafiltration and alcoholic precipitation of the contaminants. The physicochemical characterization of X-ray diffraction (XRD), gas chromatography (CGMS), magnetic resonance (NMR) and determination of sugars by the phenol-sulfuric method were performed to identify the composition and monosaccharide structure of sugars. The isolated PS presents branches of fucose, mannose, glucose, galactose and N-acetyl-glucosamine, presenting amorphous structure. Lyophilization of the polysaccharide was performed for concentration and conservation purposes. The encapsulation of the polysaccharide coupled chemically with OVA in a chitosan nano particle was aimed at increasing mucoadhesiveness and allowing greater absorption of the antigen between the cells of the sublingual mucosal epithelial junction. From the analysis of DLS (dynamic light scattering), the nanoparticles presented dimensions between 200 to 400 nm and the Zeta potential above 20. The polydispersity index (PDI) is within the expected range (below 0.3). The encapsulation capacity for OVA was 92.8% of the groups containing PS. The total serum IgG test showed that the G2 group (Nano particle with Polysaccharide and Protein coupled) was the one that had the highest reactivity in the ELISA test, by Analysis of Variance (ANOVA) with Bonferrone tool. The sIgA test showed that the G2 group (Nanoparticle with Polysaccharide and Protein coupled) had the highest concentration of total sIgA antibody. As a result and conclusion, the capsular polysaccharide of *Streptococcus agalactiae* is a good candidate for vaccine antigen.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*, conjugate vaccine, polysaccharide, sublingual mucosal immunization, nanoparticle

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** SUBUNIDADES ESTRUTURAIS DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* TIPOS IA E III E *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SOROTIPO 14. GLC, GLICOSE, GALACTOSE; GLCNAC, N-ACETIL-GLICOSAMINA; NEUNAC, ÁCIDO N-ACETIL-NEURAMÍNICO. OS PRODUTOS DE GENES QUE LEVAM À PRODUÇÃO DE CÁPSULA POLISSACARÍDICA (CP) DE *S. AGALACTIAE* TIPO IA SÃO HOMÓLOGOS ÀS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE CÁPSULA POLISSACARÍDICA (CP) DE *S. AGALACTIAE* TIPO III E *S. PNEUMONIAE* SOROTIPO 14 (FONTE: YAMAMOTO *ET AL.*, 1999). 29
- FIGURA 2** TREZE METABÓLITOS PRECURSORES ESSENCIAIS PARA A FORMAÇÃO DE BLOCOS DE CONSTRUÇÃO, MACROMOLÉCULAS E ESTRUTURAS. FONTE: SCHAECHTER *ET AL.* (2002). 31
- FIGURA 3** GRÁFICO DE PIZZA COM O TOTAL DE OCORRÊNCIAS DE ÓBITOS POR OCORRÊNCIA POR REGIÃO SEGUNDO CAPÍTULO CID-10: XVI. ALGUMAS AFECÇÕES ORIGINADAS NO PERÍODO PERINATAL FAIXA ETÁRIA 1: 0 A 6 DIAS PERÍODO: 2016 35
- FIGURA 4** ÓBITOS INFANTIS - BRASIL ÓBITOS POR OCORRÊNCIA POR REGIÃO/UNIDADE DA FEDERAÇÃO E REGIÃO CAPÍTULO CID-10: XVI. ALGUMAS AFECÇÕES ORIGINADAS NO PERÍODO PERINATAL CATEGORIA CID-10: P36 SEPTICEMIA BACTERIANA DO RECÉM-NASCIDO FAIXA ETÁRIA 1: 0 A 6 DIAS PERÍODO: 2016 37
- FIGURA 5** DETALHAMENTO DA FUNÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO COMO SISTEMA DE DEFESA CONTRA AGENTES INFECCIOSOS. 43
- FIGURA 6** PRODUÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE 46
- FIGURA 7** A IMUNIZAÇÃO DA MUCOSA NASAL ESTIMULA RESPOSTA IMUNE NO TRATO RESPIRATÓRIO E, TAMBÉM, PODE DAR ORIGEM À FORTE RESPOSTA IMUNOLÓGICA DA MUCOSA GENITAL-VAGINAL. SOMBREAMENTO INDICA FORÇA DE RESPOSTA (HOLMGREN E CZERKINSKY (2005). 50
- FIGURA 8** MECANISMO DE COOPERAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS T E B NAS VACINAS CONJUGADAS DE PROTEÍNAS E POLISSACARÍDEOS. PODE SER VISTA A DIFERENÇA DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA QUANDO SE UTILIZA APENAS O POLISSACARÍDEO COMO ANTÍGENO (A) E QUANDO OCORRE A CONJUGAÇÃO ENTRE O POLISSACARÍDEO E UMA PROTEÍNA CARREADORA (POLLARD, PERRETT E BEVERLEY, 2009). 55
- FIGURA 9** BANCO DE TRABALHO: CONDIÇÕES DE CULTIVO: DESCONTÍNUO EM BATELADA EM SHAKER, ERLLENMEYER COM 100 ML DE MEIO COM INÓCULO GBS, TEMPERATURA 37°C, TEMPO DE INCUBAÇÃO 12 HORAS-14 HORAS, VELOCIDADE A 250 RPM NO NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC EXCELLA® INCUBATOR SHAKER 63
- FIGURA 10** MODELO DO PLANEJAMENTO DO BANCO SEMENTE, BANCO MESTRE E BANCO DE TRABALHO COM MEIOS BHI E TSB: SEM INÓCULO (BRANCO), SUPLEMENTADO COM INOSINA, L-PROLINA, ÁCIDO NICOTÍNICO E OS TRÊS SUPLEMENTOS EM CONJUNTO. 64

FIGURA 11 ESQUEMA DE PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO, COM AS ETAPAS DE INATIVAÇÃO, ELIMINAÇÃO DE DENDRITOS CELULARES, ÁCIDOS NUCLEICOS, TRATAMENTO ENZIMÁTICO, ULTRAFILTRAÇÃO E SECAGEM.	68
FIGURA 12 ANÁLISE MICROSCÓPICA DO GBS E PLACA DAS COLÔNIAS CULTIVADA EM MEIO BHI DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> IA EM FORMA DE <i>COCCUS</i>	80
FIGURA 13 RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO REALIZADO PELO PROGRAMA BLAST PARA IDENTIFICAÇÃO DA ANÁLISE DE GENE RRNA 16S DO <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i>	81
FIGURA 14 ANÁLISE DO CRESCIMENTO CELULAR DOS MEIOS DE CULTIVO TSB E BHI – ABSORBÂNCIA N=600 NM. OS DADOS OBTIDOS DEMONSTRAM QUE NÃO HOUVE DIFERENÇA ESTATÍSTICA SIGNIFICANTE: PARA O CRESCIMENTO CELULAR, ENTRE O MEIO BHI E O MEIO TSB (P VALUE 0,4417), ENTRE A FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO.	83
FIGURA 15 ANÁLISE DO CRESCIMENTO CELULAR NO MEIO DE CULTURA TSB COM DIFERENTES SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS (I - INOSINA, P - L-PROLINA, N – ÁCIDO NICOTÍNICO)	85
FIGURA 16 CURVAS PADRÕES DE GLICOSE, GALACTOSE E SUCROSE, BEM COMO A MISTURA DOS TRÊS NA PROPORÇÃO 2:2:1	89
FIGURA 17 DOSAGEM DE POLISSACARÍDEO A PARTIR DO MÉTODO FENOL SULFÚRICO E LEITURA EM ESPECTROFOTÔMETRO (MEIO DE CULTURA UTILIZADO: TSB SUPLEMENTADO COM L-PROLINA)	90
FIGURA 18 DIFRAÇÃO DE RAIOS X DO PS APÓS SEREM REALIZADOS NOVO CULTIVO E PURIFICAÇÃO	91
FIGURA 19 PICOS CROMATOGRÁFICOS A PARTIR DA REAÇÃO DE ACETILAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DA IDENTIDADE ATRAVÉS DA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA	92
FIGURA 20 ESPECTRO 1D DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA PAREDE CELULAR DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> (SOROTIPO IA). A REGIÃO DOS SINAIS ANOMÉRICOS FOI MAGNIFICADA PARA MELHOR VISUALIZAÇÃO. OS SINAIS DESIGNADOS COMO GF1, R1, GA1, G1 E GN1 REFEREM-SE AOS SINAIS DOS PRÓTONS ANOMÉRICOS B-D-GLCF, A-L-RHAP, B-D-GALP, B-D-GLCP E B-D-GLCPNAC, RESPECTIVAMENTE. VER TABELA 19 PARA MAIS INFORMAÇÕES RELACIONADAS AO DESLOCAMENTO QUÍMICO $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DAS UNIDADES DE B-D-GLICOFURANOSE, A-L-RAMNOPIRANOSE, B-D-GALACTOPIRANOSE, B-D-GLICOPIRANOSE E B-D-N-ACETIL-GLICOPIRANOSAMINA.	94
FIGURA 21 CARACTERIZAÇÃO NMR POR 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQCED (A) E SINAIS ANOMÉRICOS MAGNIFICADOS PARA MELHOR VISUALIZAÇÃO DOS SINAIS (B).	95
FIGURA 22 ESPECTRO 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC EDITADO DO POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA PAREDE CELULAR DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> (SOROTIPO IA). NO PAINEL A, A REGIÃO DOS SINAIS ANOMÉRICOS FOI MAGNIFICADA PARA MELHOR VISUALIZAÇÃO DOS SINAIS. NO PAINEL B, A REGIÃO TÍPICA DOS SINAIS DO ANEL DE AÇÚCARES	

MOSTRA O ASSINALAMENTO DOS PRINCIPAIS RESÍDUOS IDENTIFICADOS. A NOMENCLATURA DOS SINAIS ENCONTRA-SE DESCRITA NA FIGURA 20. VER TABELA 18 PARA MAIS INFORMAÇÕES RELACIONADAS AO DESLOCAMENTO QUÍMICO $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DAS UNIDADES DE B-D-GLICOFURANOSE, A-L-RAMNOPIRANOSE, B-D-GALACTOPIRANOSE, B-D-GLICOPIRANOSE E B-D-N-ACETIL-GLICOPIRANOSAMINA.	96
FIGURA 23 ESPECTRO DE CARACTERIZAÇÃO DE NMR POR 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ PHASE-TOCSY DO EXOPOLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA PAREDE CELULAR DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> (SOROTIPO IA). AMBOS OS PAINÉIS, A E B, CORRESPONDEM À REGIÃO DOS SINAIS ANOMÉRICOS IDENTIFICADOS PARA A AMOSTRA. NO PAINEL A, SÃO MOSTRADAS AS CORRELAÇÕES INTRA E INTER-RESÍDUOS IDENTIFICADOS PARA β -D-GLICOFURANOSE E A-L-RAMNOPIRANOSE, ENQUANTO, NO PAINEL B, SÃO MOSTRADAS AS CORRELAÇÕES INTRA E INTER-RESÍDUOS IDENTIFICADAS PARA β -D-GALACTOPIRANOSE, β -D-GLICOPIRANOSE E β -D-N-ACETIL-GLICOPIRANOSAMINA. VER TABELA 18 PARA MAIS INFORMAÇÕES RELACIONADAS AO DESLOCAMENTO QUÍMICO $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ DAS UNIDADES ASSINALADAS.	97
FIGURA 24 ESTRUTURAS APROXIMADAS PARA O POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA PAREDE CELULAR DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> (SOROTIPO IA.). AS ESTRUTURAS 1 E 2 CORRESPONDEM ÀS DUAS POSSÍVEIS CADEIAS QUE FAZEM PARTE DA COMPOSIÇÃO DA ESTRUTURA DESTA POLISSACARÍDEO. AS ESTRUTURAS FORAM MONTADAS COM BASE NOS DADOS OBTIDOS ATRAVÉS DOS EXPERIMENTOS DE NMR E CGMS.	98
FIGURA 25 CADEIA ESTRUTURAL PROPOSTA PELO TRABALHO REALIZADO POR YAMAMOTO E COLABORADORES (1999) NA QUAL, PODE-SE IDENTIFICAR QUE A MAIORIA DOS AÇUCARES SÃO SEMELHANTES, MAS A ESTRUTURA CAPSULAR DIVERGE DA NOSSA PROPOSTA.	99
FIGURA 26 ANÁLISE DE DSC (CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL) COM A IDENTIFICAÇÃO DE TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA, TEMPERATURA DE FUSÃO E TEMPERATURA EUTÉTICA.	100
FIGURA 27 ANÁLISE DA TEMPERATURA DE COLAPSO PELO LYOSTAT. (A) TEMPERATURA AMBIENTE -LÍQUIDO +25° C, (B) TEMPERATURA EUTÉTICA -23.1°C (C) TEMPERATURA DE COLAPSO -33,7 °C.	100
FIGURA 28 APARÊNCIA FINAL DO CAKE LIOFILIZADO DO PS	101
FIGURA 29 DADOS BRUTOS DE OBTENÇÃO DO POTENCIAL ZETA E DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA	103
FIGURA 30 TÍTULO DE ANTICORPOS SÉRICOS IGG TOTAL	104
FIGURA 31 CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPOS SIGA TOTAL	106

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 ÓBITOS POR OCORRÊNCIA POR CAPÍTULO CID-10, SEGUNDO REGIÃO/UNIDADE DA FEDERAÇÃO, CAPÍTULO CID-10: XVI. ALGUMAS AFECÇÕES ORIGINADAS NO PERÍODO PERINATAL, FAIXA ETÁRIA 1: 0 A 6 DIAS. PERÍODO: 2014 E 2016 (FONTE: MS/SVS/CGIAE – MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. 2014 E 2016)	34
TABELA 2 ÓBITOS POR OCORRÊNCIA POR CAPÍTULO CID-10, SEGUNDO REGIÃO/UNIDADE DA FEDERAÇÃO. LISTA MORTALIDADE CID-10: SEPTICEMIA BACTERIANA DO RECÉM-NASCIDO P36 FAIXA ETÁRIA 1: 0 A 6 DIAS. PERÍODO: 2014 E 2016 TOTAL. (FONTE: MS/SVS/CGIAE – MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. 2014 E 2016).	36
TABELA 3 TOTAL DE MORTES DE RECÉM-NASCIDO NO ANO DE 2016, POR INFECÇÕES ORIGINADAS NO PERÍODO PERINATAL, INCLUINDO SEPSEMIA E INFECÇÕES BACTERIANAS.	38
TABELA 4 AS BARREIRAS IMUNOLÓGICAS NATURAIS, DIFERENCIAÇÃO DA IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA (TURVEY E BROIDE, 2010).	43
TABELA 5 CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA.	44
TABELA 6 DIFERENÇAS ENTRE VÁRIOS TIPOS DE VACINAS (GSK VACINAS)	48
TABELA 7 ETAPAS DO MODELO VACINAL E AS CARACTERIZAÇÕES NECESSÁRIAS PARA CADA UMA DELAS: CULTIVO E FERMENTAÇÃO, PURIFICAÇÃO E EXTRAÇÃO, ENCAPSULAMENTO EM NANOPARTÍCULA, LIOFILIZAÇÃO, INOCULAÇÃO E IMUNIZAÇÃO.	59
TABELA 8 SUPLEMENTOS ESCOLHIDOS PARA SEREM ADICIONADOS AO MEIO DE CULTIVO, OBJETIVANDO ESTIMULAR AS ROTAS METABÓLICAS E AUMENTAR A PRODUÇÃO DE CÁPSULA POLISSACARÍDICA.	63
TABELA 9 TABELA DESCRITIVA DOS EXPERIMENTOS DE CULTIVOS CELULARES COM RESPECTIVOS MEIOS DE CULTURA E SUPLEMENTOS NUTRICIONAIS, CORRESPONDENTE À PRIMEIRA FASE DE PRÉ-INÓCULO (FI) E POSTERIOR CULTIVO DO INÓCULO (FII). OS FRASCOS FORAM IDENTIFICADOS DE A ATÉ N, COM MEIOS DE CULTURA TSB (MEIO DE SOJA) E BHI (INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO) COM OS SUPLEMENTOS: INOSINA, L-PROLINA E ÁCIDO NICOTÍNICO, EM CONDIÇÕES DE CULTIVO DESCONTÍNUO EM BATELADA: TEMPERATURA 37°C, TEMPO DE INCUBAÇÃO 12 HORAS, PH 7,2-7,4, VELOCIDADE A 250 RPM NO NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC EXCELLA® INCUBATOR SHAKER	65
TABELA 10 ESQUEMA DE INOCULAÇÃO E COLETA DE SANGUE DOS CAMUNDONGOS. O ESQUEMA DE IMUNIZAÇÃO FOI BASEADO EM TRÊS DOSES SUBLINGUAIS, COM INTERVALO DE 1 SEMANA ENTRE ELAS E DUAS DOSES INTRAPERITONEAL	76

TABELA 11 GRUPOS DE CONTROLE DE IMUNIZAÇÃO E NÚMERO DE ANIMAIS UTILIZADOS. OS ANIMAIS FORAM DIVIDIDOS EM GRUPOS (G) DE 6 CAMUNDONGOS CADA. OS CAMUNDONGOS DOS GRUPOS G1, G2, G3, G4, G7 E G8 FORAM IMUNIZADOS VIA SUBLINGUAL, NOS DIAS 0, 7 E 14. OS CAMUNDONGOS DOS GRUPOS G5 E G6 FORAM IMUNIZADOS VIA INTRAPERITONEAL, NOS DIAS 0 E 14. FOI COLETADO SANGUE, VIA MANDIBULAR, NOS DIAS 7, 14 E 28, APÓS A PRIMEIRA IMUNIZAÇÃO, PARA TITULAÇÃO DE ANTICORPOS TOTAIS.	78
TABELA 12 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE ASSUMIDA (SCORE ACIMA DE 2); OU SEJA, IDENTIDADE PERFEITA	80
TABELA 13 COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA DE BHI E TSB (FABRICANTE MERCK S.A.), UTILIZADOS PARA EXPANSÃO DO INÓCULO E FERMENTAÇÃO, CONSTANTES NO RÓTULO.	82
TABELA 14 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE BONFERRONI COM OS TRÊS SUPLEMENTOS (INOSINA, L-PROLINA E ÁCIDO NICOTÍNICO)	86
TABELA 15 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA SECA PRODUZIDA (MG/ML) COM O MEIO TSB E COM OS DIFERENTES SUPLEMENTOS I (INOSINA), N (ÁCIDO NICOTÍNICO), P (L-PROLINA) E I_N_P (COMPOSIÇÃO DOS TRÊS NUTRIENTES)	86
TABELA 16 CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO (MG/ML) NO MEIO TSB ADICIONADO COM OS DIFERENTES SUPLEMENTOS E A RELAÇÃO DE CONCENTRAÇÃO DE POLISSACARÍDEO POR BIOMASSA	88
TABELA 17 COMPOSIÇÃO DO PS DO <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> IA A PARTIR DA REAÇÃO DE ACETILAÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DA IDENTIDADE ATRAVÉS DA ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA	93
TABELA 18 DESLOCAMENTO QUÍMICO $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (PPM) DAS UNIDADES DE B-D-GLICOFURANOSE, A-L-RAMNOPIRANOSE, B-D-GALACTOPIRANOSE, B-D-GLICOPIRANOSE E B-D-N-ACETIL-GLICOPIRANOSAMINA IDENTIFICADAS NA ESTRUTURA DO EXOPOLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DA PAREDE CELULAR DE <i>STREPTOCOCCUS AGALACTIAE</i> (SOROTIPO IA.). OS SINAIS EM ITÁLICO REPRESENTAM AS LIGAÇÕES GLICOSÍDICAS IDENTIFICADAS NO ESPECTRO 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ PHASE-TOCSY.	98
TABELA 19 CICLO DE CONGELAMENTO E CICLO DE SECAGEM A PARTIR DOS PARÂMETROS OBTIDOS NO DSC E LIOSTAT	101
TABELA 20 TAMANHO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO (PDI) DAS NANOPARTÍCULA DE QUITOSANA 2MG/ML E TPP 1 MG/ML NOS DIFERENTES GRUPOS DE IMUNIZAÇÃO	102
TABELA 21 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE BONFERRONE ENTRE OS GRUPOS IMUNIZADOS, AVALIANDO-SE O TÍTULO DE ANTICORPO SÉRICO IGG CONTRA POLISSACARÍDEO.	105
TABELA 22 ANÁLISE ESTATÍSTICA ANOVA COM FERRAMENTA DE BONFERRONE ENTRE OS GRUPOS IMUNIZADOS, AVALIANDO-SE A CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPO SECRETOR SIGA TOTAL.	106

TABELA 23 PLANEJAMENTO PARA O DESENVOLVIMENTO DA VACINA POLISSACARÍDICA
CONTRA *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* PARA GESTANTES ATRAVÉS DO “PERFIL DE
PRODUTO ALVO” (TPP)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AIP	Antibioticoprofilaxia intraparto
AN	Ácidos nucleicos
APC	Células apresentadoras de antígeno
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Meio de cultura <i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina bovina)
CD4+	Receptor 4 de linfócito T auxiliar
Cetaflon	Brometo de cetiltrimetilamônio
CP	Cápsula polissacarídica
C _p	Concentração de proteína
C _{ps}	Concentração de polissacarídeo
CGMS	Cromatografia gasosa
DOC	Desoxicolato de sódio (<i>sodium deoxycholate</i> detergente)
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EEB	Encefalopatia espongiforme bovina
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FDNB	Fluorodinitrobenzeno
GBS	<i>Streptococcus</i> do grupo B
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IgG	Imunoglobulina de classe G
sIgA	Imunoglobulina de classe A secretora
KDA	Quilodáltons
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de histocompatibilidade

mM	Milimolar
NMR	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
OVA	<i>Ovalbumin</i> (Albumina de ovo)
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PS	Polissacarídeo capsular
SDS Page	Eletroforese em poliacrilamida na presença de SDS
sIgA	Imunoglobulina secretora de classe A
SUS	Sistema Único de Saúde
Th1	Células T auxiliar 1
Th2	Células T auxiliar 2
TPP	Tripolifosfato de sódio
TSP	Meio de cultura <i>Tryptic Soy Broth</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)

Sumário

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	23
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1	<i>Microbiota humana e Streptococcus do grupo B.....</i>	25
2.2	<i>Sorotipo capsular do Streptococcus do grupo B.....</i>	26
2.3	<i>Importância da cápsula polissacarídica do Streptococcus do grupo B</i>	26
2.4	<i>Estrutura conformacional e metabolismo da cápsula polissacarídica bacteriana do Streptococcus agalactiae.....</i>	27
2.5	<i>Manifestações clínicas da infecção por Streptococcus agalactiae</i>	32
2.7	<i>Prevenção atual contra o Streptococcus agalactiae</i>	38
2.8	<i>Sistema imunológico.....</i>	42
2.9	<i>Imunidade de mucosa</i>	49
2.10	<i>Vacinação de gestantes</i>	52
2.11	<i>Nanopartículas de quitosana para carreamento de antígenos</i>	53
2.12	<i>Vacinas polissacarídicas</i>	54
2.13	<i>Vacinas contra o Streptococcus agalactiae</i>	56
3	OBJETIVOS.....	58
3.1	<i>Objetivos gerais</i>	58
3.2	<i>Objetivos específicos</i>	58
4	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1	<i>Plano de trabalho.....</i>	59
4.2	<i>Caracterização, cultivo e fermentação.....</i>	60
	<i>Origem: Cepa de Streptococcus agalactiae</i>	60
	<i>Pureza e contaminação.....</i>	60
	<i>Confirmação de identidade</i>	61

<i>Organização do Banco Mestre e do Banco de trabalho</i>	61
<i>Banco de Trabalho</i>	62
4.3 <i>Escolha do meio de cultivo (BHI ou TSB)</i>	66
4.4 <i>Purificação para extração do polissacarídeo (PS)</i>	66
<i>Quantificação relativa dos açúcares no polissacarídeo</i>	68
<i>Pesagem da massa seca: concentração de polissacarídeo</i>	69
<i>Deteção de proteínas - Eletroforese SDS-PAGE</i>	69
<i>Dosagem de proteínas (kit de ensaio de proteínas micro BCA)</i>	69
<i>Doseamento de ácido nucleico</i>	70
<i>Identificação de cristalinidade - Difração de Raios-X</i>	70
<i>Identificação da composição monossacarídica – cromatografia gasosa CGMS</i> ..	70
<i>Identificação da estrutura – Ressonância Magnética (NMR)</i>	71
<i>Liofilização do polissacarídeo</i>	72
4.5 <i>Encapsulamento em Nanopartícula</i>	73
<i>Determinação da taxa de encapsulamento</i>	74
<i>Análise de espalhamento dinâmico da luz (DLS) – tamanho da Nanopartícula</i> ..	75
4.6 <i>Imunização de mucosas sublinguais</i>	75
<i>Esquema de imunização</i>	75
<i>Grupos de imunização</i>	77
4.7 <i>Análise estatística</i>	78
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1 <i>Caracterização da cepa: identificação, pureza e contaminação</i>	80
5.2 <i>Cultivo - Concentração celular (DO 600 nm) nos meios TSB e BHI</i>	82
5.3 <i>Escolha do meio TSB (infusão de tripsina de soja)</i>	84
5.4 <i>Diferentes suplementos nutricionais em meio TSB</i>	85
5.5 <i>Avaliação da produção de cápsula polissacarídica</i>	87
5.6 <i>Avaliação da purificação com L-prolina no meio de cultura TSB</i>	88

5.7	<i>Liofilização do polissacarídeo</i>	99
5.8	<i>Taxa de encapsulamento indireta por determinação de proteína acoplada ...</i>	101
5.9	<i>Análise de espalhamento dinâmico da luz (DLS)</i>	102
5.10	<i>Análise da resposta imune</i>	104
6	CONCLUSÕES	108
7	AGRADECIMENTOS	110
8	SUGESTÃO PARA PESQUISA FUTURA	110
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
10	ANEXOS DIVERSOS:	122
11	ANEXO: FICHA DO ALUNO	125
12	ANEXO: CURRICULUM LATTES	130
13	ANEXO: CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	132

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A *Streptococcus agalactiae* (GBS) é uma bactéria gram-positiva do gênero cocos, grupo B, responsável por alta morbidade e mortalidade precoce de recém-nascidos durante o parto normal (KOBAYASHI *et al.* 2016; NUCCITELLI *et al.*, 2015; MERCER e BRIGGS, 1996; SCASSO *et al.*, 2015; BAKER 2000). Frequentemente, é encontrada na microbiota humana, fazendo parte das membranas de mucosas e colonizando, principalmente, os tratos gastrointestinais e geniturinários.

Por motivos ainda não totalmente elucidados, aproximadamente 20 a 30% das gestantes apresentam proliferação dessa bactéria de maneira desequilibrada. Essa infecção pode ser transitória, intermitente ou crônica (NUCCITELLI *et al.*, 2015; SCASSO *et al.*, 2015; ALÓS CORTÉS *et al.*, 2013; MERCER e BRIGGS, 1996). Este desequilíbrio, quando ocorre, torna o GBS potencialmente patogênico e pode ocasionar contaminação do neonato durante o parto natural, levando-o à septicemia.

Além dos estudos sobre bacteremia em neonatos, o estreptococo do grupo B vem sendo uma preocupação crescente em adultos com complicações cardiovasculares e doenças crônicas. Há suspeitas de aumento da incidência de doenças, causadas pelo GBS, em pacientes com idade acima de 65 anos e com condições médicas crônicas, como: diabetes mellitus, câncer, doenças cardiovasculares, doenças hepáticas crônicas, doença renal e neoplasia, infecções cutâneas e de tecidos moles (MATSUDA *et al.*, 2014; OYANGUREN *et al.*, 2015; HIGH *et al.*, 2005; FARLEY *et al.*, 1993).

Este trabalho busca estudar um modelo de produção de antígeno vacinal a partir da cápsula polissacarídica do *Streptococcus agalactiae*, encapsulada em uma Nanopartícula de quitosana para *delivery* de mucosas sublinguais.

A cápsula polissacarídica bacteriana é responsável pela antigenicidade, que também confere adesão à mucosa e, conseqüentemente, à sua colonização (JANS e BOLEIJ, 2018.). Uma vacina polissacarídica promoveria a geração de anticorpos específicos que evitariam a adesão à mucosa e inibiriam a colonização do microrganismo.

Nas diferentes formulações, foi utilizada uma proteína de OVA (ovalbumina), com o objetivo de aumentar a resposta imunológica, pois vacinas polissacarídicas não são capazes de induzir alta concentração de anticorpos e resposta imunológica de longo prazo (DÍEZ-DOMINGO *et al.*, 2010). A utilização de proteínas ligadas molecularmente, como carreador, nas vacinas polissacarídicas é importante, pois essas proteínas são altamente

imunogênicas e consideradas antígenos dependentes das células T; conseqüentemente, são capazes de ativar as respostas imunitárias primárias e secundárias de maneira mais eficiente e com maior potência (ZHETEYEVA *et al.*, 2013).

A estratégia de encapsulamento do antígeno em Nanopartículas de quitosana busca melhorar o fornecimento do antígeno, aumentando, assim, sua disponibilidade sobre a mucosa em função da mucoadesividade e de sua liberação controlada. A utilização da quitosana tem como vantagem ser um biopolímero, com biocompatibilidade e tolerabilidade, além de excelente capacidade de aderência a mucosas (XIA *et al.*, 2015).

No processo de encapsulamento, foi utilizada a vitamina B9 (L-metilfolato), com função de estimular a produção de anticorpos, pois ela se liga a células MR1 da classe *MHCI-like*. Derivados da vitamina B podem se ligar a uma proteína apresentadora de antígenos que estimule células imunológicas especializadas (CHUA e HANSEN, 2012).

O modelo vacinal via mucosas sublinguais tem foco preventivo e terapêutico. A vacinação via mucosa geralmente desencadeia ambas as respostas imunes: a resposta imune sistêmica e a de mucosas, enquanto a resposta às vacinas injetadas é predominantemente sistêmica. Não é invasiva, tem menos efeitos adversos, não tem efeito inflamatório exacerbado e permite reforço frequente. Uma vacina de mucosas geralmente não interfere na imunidade sistêmica preexistente, aumentando assim a taxa de "efetividade" da vacina (KRAEHENBUHL e NEUTRA, 2013). Conseqüentemente, as vacinas via mucosa são mais seguras, para uso em gestantes, uma vez que as vacinas injetáveis ocasionam inflamação sistêmica e podem levar à resposta imune mais intensa, ocasionando aborto. Corrobora o fato de que o desenvolvimento de vacinas não injetáveis tem sido estimulado pelo Fórum de Vacinas Globais e Pesquisas em Imunização, com participação da WHO (World Health Organization) (FORD *et al.*, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2014; CALAM, 2004).

O modelo vacinal foi avaliado por meio de imunização sublingual em camundongos, nos quais as concentrações de IgG e sIgA da saliva foram determinadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota humana e *Streptococcus* do grupo B

A microbiota normal em seres humanos desenvolve-se por sucessões; ou seja, desde o nascimento até as diversas fases da vida adulta, existe desenvolvimento contínuo, resultando em colônias bacterianas estáveis. Os fatores que controlam a composição da microbiota, em uma dada região do corpo, estão relacionados à natureza do ambiente local, tais como temperatura, pH, água, oxigenação, nutrientes e fatores complexos, assim como da ação de componentes do sistema imunológico. Esta diversidade da composição da microbiota é importante para a manutenção da saúde, para o controle de espécies patogênicas e para a proteção do sistema imunológico primário.

O microrganismo da espécie *Streptococcus agalactiae* (GBS) já faz parte da microbiota humana, estando presente nos tratos geniturinários e gastrointestinal (ARDOLINO *et al.*, 2016). Alterações hormonais, bem como variações relacionadas com a natureza do ambiente local (como temperatura, pH, água, oxigenação, nutrientes), além de outros fatores complexos relacionados à ação de componentes do sistema imunológico, podem atuar sobre a microbiota significativamente, desequilibrando-a e, assim, favorecendo o crescimento deste microrganismo de forma “patógeno oportunista”.

Os microrganismos GBS pertencem ao grupo filogenético *Bacteria* grupo B em virtude de suas características antigênicas. Assim como as outras espécies do gênero, GBS são cocos gram-positivos, catalase-negativa, hemólise beta, oxidase-negativa, que caracteristicamente crescem aos pares ou em cadeias; são imóveis e não esporulados. Considerando-se o metabolismo energético, são classificados como anaeróbios facultativos, obtendo energia para a síntese de material celular através da fermentação dos carboidratos (CASTELLANO *et al.*, 2008).

O *Streptococcus agalactiae* do grupo B de Lancefield foi identificado nos Estados Unidos, na década de 1960, destacando-se como a principal causa infecciosa de morbidade e mortalidade de neonatos e permanecendo até hoje como a principal causa de sepse em recém-nascidos (MERCER e BRIGGS, 1996; MADHI *et al.*, 2013; SCASSO *et al.*, 2015).

2.2 Sorotipo capsular do *Streptococcus* do grupo B

Os GBS diferenciam-se em dez sorotipos distintos relacionados aos determinantes antigênicos da superfície celular, sendo classificados como: Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX. Os dez sorotipos capsulares se distinguem de acordo com a variação da virulência e de antígenos, os quais são detectados por imunodifusão ou PCR (FIOLO *et al.*, 2011; FIOLO *et al.*, 2012). A identificação dos sorotipos é crítica para estudos clínicos e epidemiológicos.

Para Fiolo e colaboradores (2011), entre os dez sorotipos conhecidos, o III é o mais encontrado em doenças que acometem recém-nascidos (meningite e septicemia), o sorotipo Ia (correspondente a O90 ATCC 12386 - Speziale *et al.*, 2005) é o mais detectado em amostra vaginal de mulheres grávidas e o sorotipo V tem prevalecido nas infecções em adultos, excluindo mulheres grávidas. No Japão, a maior incidência em recém-nascidos está com os tipos capsulares Ia, Ib e III (MOROZUMI *et al.*, 2015). Para Baker (2000), a incidência de infecção pelo sorotipo Ia tem crescido nas últimas décadas, sendo prevalente com o tipo III nos casos graves de infecção.

Dutra e colaboradores (2014) relatam que os dez sorotipos capsulares já foram identificados, sendo que a determinação de sua distribuição dentro de uma população específica ou região geográfica é importante, porque eles são os principais alvos para o desenvolvimento de estratégias vacinais. No Brasil, os sorotipos predominantes são: Ia (27,6%), II (19,1%), Ib (18,7%) e V (13,6%), seguidos por sorotipos IV (8,1%) e III (6,7%). Todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos beta-lactâmicos testados e 97% eram resistentes à tetraciclina. A resistência à eritromicina e à clindamicina foi encontrada em 4,1% e 3% dos isolados, respectivamente.

2.3 Importância da cápsula polissacarídica do *Streptococcus* do grupo B

A cápsula polissacarídica é um polímero de alta massa molecular, composta de subunidades repetitivas de oligossacarídeos, constituídas por diferentes moléculas de açúcares e unidas por ligações glicosídicas. De acordo com as diferentes estruturas da cápsula, a bactéria é classificada em sorotipos diversos. Essas diferenças químicas dos sorotipos identificados de GBS são associadas à cápsula polissacarídica, que lhes confere o fator de virulência e as propriedades antifagocitárias e antibacterianas. Enfim, a cápsula é responsável pela virulência e pela antigenicidade, protegendo o microrganismo contra a fagocitose pelo sistema imune e conferindo-lhe a resistência aos antibióticos.

Os polissacarídeos capsulares são conhecidos como T-independentes tipo 2 (TI) e têm como principais características (LORTHIOIS, 2008):

- Não indução de memória imunológica, pela falta de envolvimento de células T na síntese de anticorpos
- Ausência de maturação de afinidade do anticorpo e diferenciação em outros isótopos (as classes induzidas são praticamente duas: IgM e IgG2)
- Não são bons ativadores do sistema complemento
- Não induzem a produção de anticorpos em crianças com menos de 2 anos, pois o sistema imunológico encontra-se em processo de maturação

As cápsulas polissacarídicas bacterianas ativam diretamente as células B, induzindo a síntese de anticorpos independentemente das células T. Assim, também induzem baixa afinidade com os anticorpos predominantemente IgM; logo, não induzem resposta imunológica e produção de anticorpos específicos, necessitando de revacinação periódica.

Outro fator de virulência que pode estar associado à cápsula polissacarídica (CPS) é a presença de ácido siálico, localizado ao redor da membrana celular, que permite que o microrganismo invada o organismo do hospedeiro sem que seja percebido pelo sistema imunológico (ARPINI, 2011). O ácido siálico, também conhecido como N-acetil-neuramínico, é encontrado de forma abundante no organismo de vertebrados, principalmente nas regiões terminais de unidades de carboidratos em glicoproteínas e glicolipídeos, estando diretamente envolvido em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo aqueles de promoção da aderência do microrganismo às superfícies epiteliais, além de inibir a fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos. O ácido siálico é um fator essencial para a patogenicidade, pois impede a deposição do componente C3b do sistema complemento, bloqueando a fagocitose (ARPINI, 2011).

2.4 Estrutura conformacional e metabolismo da cápsula polissacarídica bacteriana do *Streptococcus agalactiae*

Polissacarídeos são cadeias poliméricas constituídas por longas cadeias de unidades de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas e moléculas de hidratos de carbono. A cadeia de polissacarídeos é bastante heterogênea e possui enorme diversidade estrutural, contendo modificações da unidade de repetição. Os polissacarídeos capsulares são solúveis em água e têm pesos moleculares na ordem de 100-2.000 kDa, além de

serem lineares e consistirem em subunidades que se repetem regularmente de 1 a 6 monossacarídeos.

Os polissacarídeos da superfície celular desempenham diversos papéis, dentre os quais servir como uma barreira entre a parede celular e o ambiente, assim como mediar as interações hospedeiro-patógeno. A membrana externa das bactérias atua como uma barreira seletiva, constituída de fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos. A presença de polissacarídeos localizados na membrana externa constitui fator importante na evasão dessas bactérias à ação de células fagocitárias e ao sistema complemento durante uma infecção. A membrana externa também é uma barreira protetiva contra antibióticos, detergentes e enzimas digestivas (ALBANI, 2008).

Várias espécies de *streptococcus* produzem polissacarídeos (ISAAC, 1979), sob a forma de cápsulas exopolissacarídicas, segregados ou associados, que podem ocorrer na forma tanto exocelular (como uma cápsula envolvente e associadas a bactérias) quanto na extracelular (como um “muco” disperso livremente no fluido de cultura).

Embora as propriedades biológicas e as estruturas de unidade de repetição de polissacarídeos de síntese sejam diversas, a análise da sequência dos genes necessários para a sua produção revelou grau de conservação entre os cinco principais genes encontrados no aglomerado de genes da cápsula, de cada um dos vários *streptococcus* produtores de polissacarídeos. A partir desta identificação, ficou evidente a importância de se estudar e entender melhor a conformação química da cápsula.

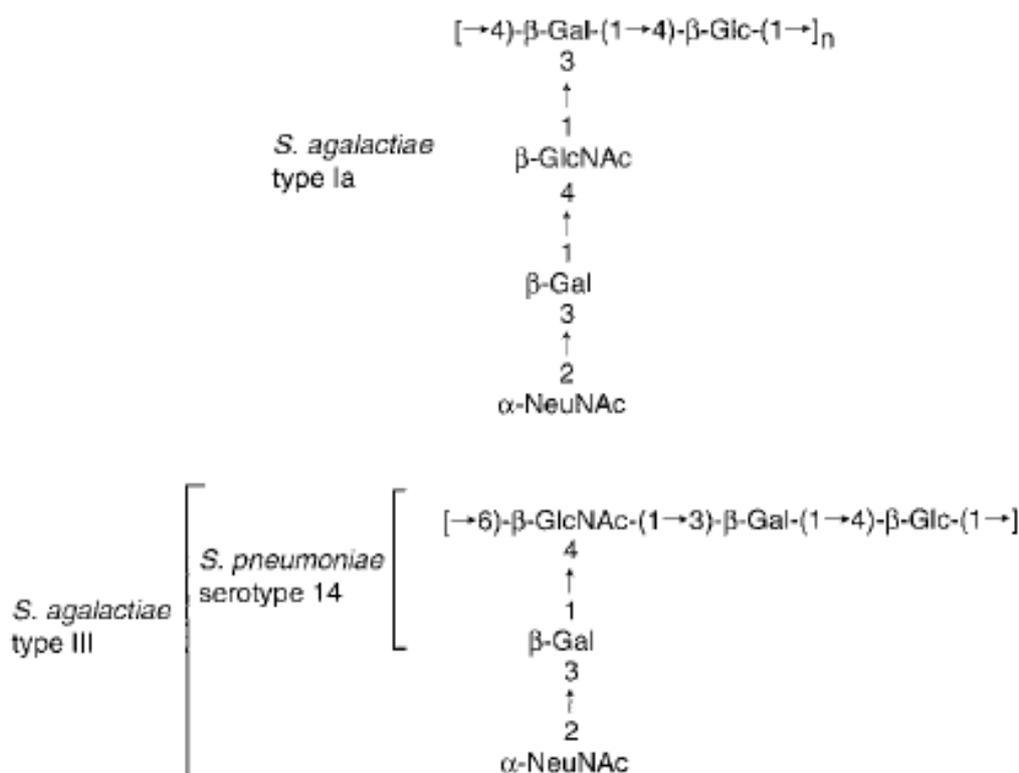
Conformação da cápsula polissacarídica

A cápsula polissacarídica tem uma sequência específica, entre 2 e 8 resíduos de sacarídeos repetidos com ligação covalente. A especificidade da sequência de repetição covalente dá origem a propriedades antigênicas específicas, utilizadas para classificar este grupo de polissacarídeos. A natureza polar permite que o polissacarídeo contenha grande quantidade de água, formando uma matriz semelhante a gel na superfície da parede celular bacteriana, que proporciona proteção contra danos físicos e atua como uma barreira para controlar as ações química e biológica.

O polissacarídeo capsular de um *Streptococcus agalactiae* tipo Ia, do grupo B, é um polímero de elevado peso molecular, composto de pentassacarídeos com unidades de repetição: 4) - [α -D-NeupNAc- (2 \rightarrow 3) - β -D-Galp (1 \rightarrow 4)- β -D-GlcpNAc- (1 \rightarrow 3)]- β -D-Galp(1 \rightarrow 4)- β -D-Glcp-(1. Os produtos de genes que levam à produção de cápsula polissacarídica (CP) de *S. agalactiae* tipo Ia são homólogos às proteínas envolvidas na

síntese de cápsula polissacarídica (CP) de *S. agalactiae* tipo III e *S. pneumoniae* sorotipo 14 (YAMAMOTO *et al.*, 1999).

Figura 1 Subunidades estruturais de *Streptococcus agalactiae* tipos Ia e III e *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 14. Glc, glicose, galactose; GlcNAc, N-acetil-glicosamina; NeuNAc, ácido N-acetil-neuramínico. Os produtos de genes que levam à produção de cápsula polissacarídica (CP) de *S. agalactiae* tipo Ia são homólogos às proteínas envolvidas na síntese de cápsula polissacarídica (CP) de *S. agalactiae* tipo III e *S. pneumoniae* sorotipo 14 (Fonte: YAMAMOTO *et al.*, 1999).



Bactérias encapsuladas são frequentemente associadas a doenças graves em humanos e animais. Os polissacarídeos capsulares de bactérias patogênicas conferem resistência à opsonofagocitose (YAMAMOTO *et al.*, 1999). Embora as estirpes de *Streptococcus pneumoniae* tenham CP divergentes, a estrutura unitária do tipo *S. agalactiae* Ia é semelhante às da CP de *S. pneumoniae* do sorotipo 14 e do *S. agalactiae* tipo III, de acordo com Yamamoto e colaboradores (1999). *S. agalactiae* tipo III contém as mesmas unidades de açúcar através de uma ligação polimerizada.

Marchessault e colaboradores (1979), a partir dos estudos de difração de raios X, identificaram que o polissacarídeo do *Streptococcus pneumoniae* tipo II tem conformação cristalina com a composição: poli[(1→3)-β-D-GlcpA-(1→4)-β-D-Glcp], possivelmente a conformação é helicoidal.

Isaac *et al.* (1979), por meio de estudos de difração de raios X, identificaram que as bactérias produzem enorme variedade de estruturas polissacarídicas complexas, com uma sequência de repetição covalente específica contendo de dois a oito resíduos de sacarídeos. Esta especificidade da sequência de repetição covalente dá origem a propriedades antigênicas específicas utilizadas para classificar este grupo de polissacarídeos. Através de técnicas de caracterização, tem-se determinado a composição química e, em alguns casos, as geometrias *linkages* e a sequência de ligação desses polissacarídeos.

Para Yamamoto *et al.* (1999), o polissacarídeo capsular de tipo específico (CP) de um *Streptococcus* do grupo B, *Streptococcus agalactiae* tipo Ia, é um polímero de elevado peso molecular, sendo composto do pentassacarídeo com unidade de repetição 4) - [α-d-NeupNAc- (2 → 3) - β-d-Gal P (1 → 4) -β-d-GlcpNAc- (1 → 3)] - P-d-Gal P (1 → 4) -β-d-Glcp(1).

Para Baker e colaboradores (2000), cerca de 40% das doenças invasivas relacionadas aos estreptococos isolados do grupo B (GBS) são causadas por polissacarídeo capsular (CP) tipo Ia ou Ib. Estudos de vacinas conjugadas com estes dois sorotipos e uma proteína de toxóide tetânico (TT) para maior imunogenicidade já foram realizados em coelhos. Os resultados mostraram-se positivos; foram realizados quatro ensaios randomizados para receber Ia ou Ib-TT conjugado (intervalo de dose, 3,75-63 μg do componente CPS), desacoplado Ia ou Ib CPS ou soro fisiológico. Todas as vacinas foram bem toleradas. As concentrações específicas do CPS soro IgG atingiram o pico de 4-8 semanas após a vacinação e foram significativamente maiores nos receptores de conjugado do que de CPS desacoplado. As respostas imunes aos conjugados foram dose-dependentes e correlacionadas à opsonofagocitose *in vitro*. Os resultados mostraram que existe viabilidade na inclusão de Ia e Ib-TT conjugados na formulação de uma vacina GBS multivalente.

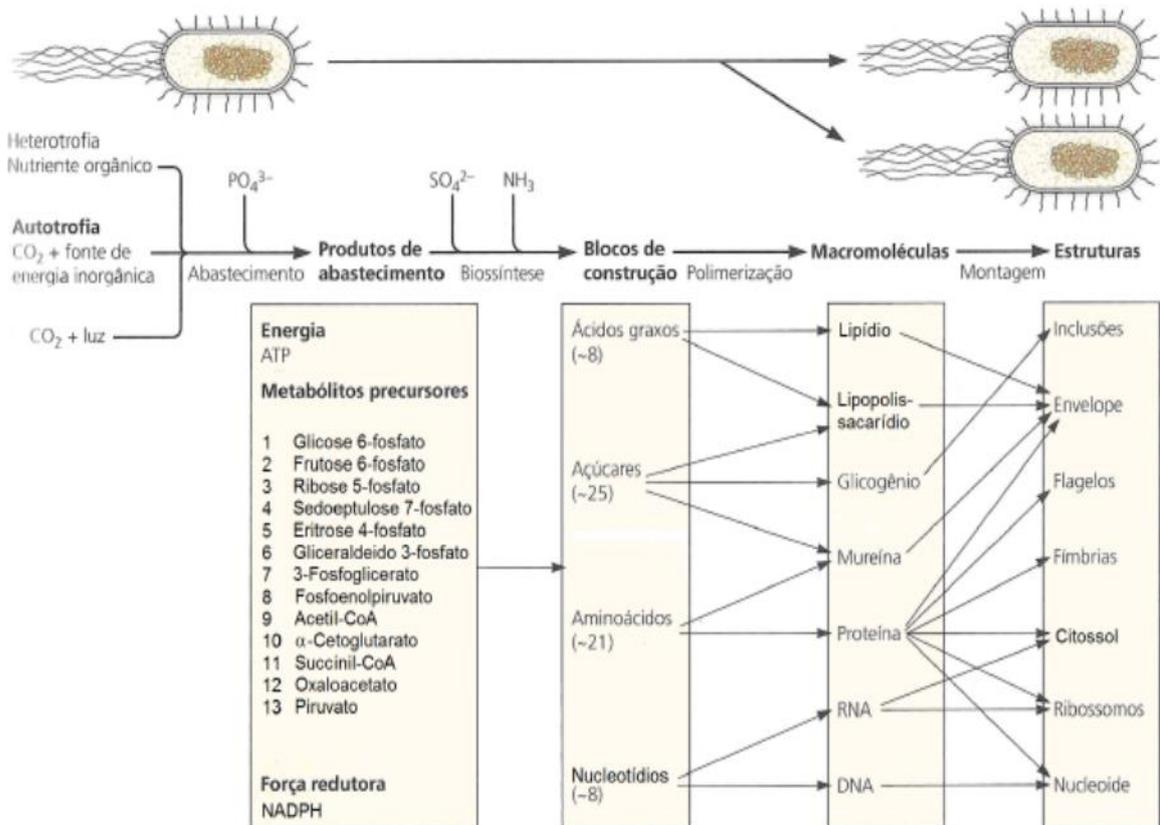
As propriedades biológicas de polissacarídeos estão relacionadas com a sua composição e estrutura. Muitos fatores, como tipos de açúcar, de ligação, peso molecular ou teor de sulfato de biopolímero, exercem influência sobre a relação entre estrutura e função (GÓMEZ-ORDÓÑEZ *et al.*, 2012). Assim, o estudo de difração de raios X e sua

análise sobre a composição é importante para planejar o melhor método para conjugação com uma proteína.

Metabolismo bacteriano e produção de cápsula polissacarídica

O metabolismo bacteriano é uma rede muito complexa de reações químicas. A partir da glicose, os microrganismos obtêm os treze compostos orgânicos intermediários principais (figura 2) que servem de precursores para a síntese de todos os outros constituintes celulares, ainda que por vias diferentes. Em princípio, o meio de cultura que contém glicose converte-se em glicose 6-fostato e, através de rotas metabólicas glicolítica, pentoses e ramos oxidativo/redutor, o microrganismo consegue produzir os metabólitos essenciais para a formação de blocos de construção, macromoléculas e estruturas.

Figura 2 Treze metabólitos precursores essenciais para a formação de blocos de construção, macromoléculas e estruturas. Fonte: Schaechter *et al.* (2002).



A virulência do GBS é complexa e multifatorial e vários determinantes de virulência estão envolvidos na adesão e na invasão de células hospedeiras, bem como na

evasão do sistema imunológico. A cápsula polissacarídica do GBS tem diferenças químicas e antigênicas que permitem a subdivisão desta espécie nos dez sorotipos existentes (DUTRA, 2014).

Objetivando-se aumentar a produção da cápsula polissacarídica e entender como os intermediários nutricionais poderiam influenciar nas rotas metabólicas e suas vias convergentes e divergentes na construção de macromoléculas, utilizou-se o Banco de Dados Kegg. KEGG (Kyoto Enciclopédia de Genes e Genomes) – uma base de dados livre que integra informação funcional genômica, química e sistêmica, capturando e organizando o conhecimento experimental nos mapas metabólicos.

2.5 Manifestações clínicas da infecção por Streptococcus agalactiae

Um dos fatores determinantes para a infecção neonatal precoce pelo *Streptococcus agalactiae* é a presença infecciosa desse microrganismo no trato genital materno no momento do nascimento. O aparelho urinário também é um importante sítio de infecção por essa bactéria, especialmente durante a gravidez, quando usualmente se manifesta como bacteriúria assintomática. Estudos já demonstraram que não existe diferença em relação à frequência da colonização quando se comparam mulheres durante as várias fases da gestação e as não gestantes (MERCER e BRIGGS, 1996).

Aproximadamente 10-30% das mulheres gestantes são colonizadas de maneira patógena por grupo B *streptococcus* (GBS) na vagina ou no reto (GANOR-PAZ *et al.* 2015). Como exemplo, estudos mostram que a taxa de colonização por GBS em gestantes na ilha de Cuba é de 27,5% (ALVAREZ CRUZ *et al.*, 2014).

O risco para o recém-nascido adquirir infecção através da transmissão vertical está diretamente relacionado ao número absoluto de microrganismos presentes no canal de parto por ocasião do nascimento e à ausência de anticorpos específicos contra o polissacarídeo capsular do *Streptococcus agalactiae*, os quais são transferidos da mãe para o recém-nascido nas últimas 10 semanas de gestação (COSTA, 2011; MOROZUMI *et al.*, 2015).

Dessa maneira, o recém-nascido de mãe colonizada, principalmente o pré-termo, é mais suscetível (10 a 15 vezes mais) a desenvolver a doença invasiva precoce. Estudos mostram que de 1% a 2% dos filhos de mulheres com cultura vaginal e/ou retal positiva apresentam sepse neonatal precoce (COSTA, 2011; MOROZUMI *et al.*, 2015).

A infecção neonatal apresenta-se sob duas formas: precoce e tardia. Quando o GBS se apresenta na forma de infecção precoce, ela ocorre nos primeiros sete dias de

vida, sendo a transmissão por via ascendente (vertical), durante o parto ou o nascimento, decorrente da contaminação do neonato por patógenos do canal do parto. Na contaminação secundária, ocorre a transmissão via transplacentária da bactéria materna para o recém-nascido. Frequentemente, a infecção evolui para bacteremia, sepse, meningite e pneumonia no neonato (SCASSO *et al.*, 2015). Os sintomas surgem, na maioria das vezes, algumas horas após o nascimento, com desconforto respiratório (presente em 35-55% dos pacientes), quadro clínico semelhante à doença pulmonar de membrana hialina e sinais clínicos de sepse em 25-40% dos casos, com evolução rápida para choque séptico em 24 horas de vida. Pode ocorrer meningite em 5-15% dos recém-nascidos, assim como pneumonia, celulite, artrite e impetigo. A evolução para o óbito ocorre comumente no segundo dia de vida.

A forma de infecção tardia afeta os recém-nascidos de sete dias até doze semanas de idade e sua transmissão pode ser horizontal ou nosocomial. A ocorrência na forma vertical é rara. Na maioria dos casos, a sepse de início tardio é decorrente de infecção hospitalar por microrganismos do ambiente onde se encontra o recém-nascido (COSTA, 2011).

Estudos experimentais *in vitro* demonstram que o *Streptococcus* penetra e sobrevive no interior de células humanas, assim como há evidências de que ele pode penetrar na cavidade amniótica através da placenta e causar infecções fulminantes no feto. O *Streptococcus* pode sobreviver por até 48 horas no interior dos macrófagos e, além disso, a eficiência da fagocitose na ausência de anticorpos anticapsulares e de complemento é muito reduzida. O recrutamento de neutrófilos para o local da infecção é prejudicado pela inativação do componente do sistema complemento pela peptidase de C5a. A septicemia se estabelece quando a bactéria, disseminada pela corrente circulatória, alcança e se prolifera em diferentes tecidos (meninges, ossos e articulações). A liberação das substâncias pró-inflamatórias pela bactéria é responsável pelo início do choque tóxico (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Ela também pode causar infecção na gestante (15%), o que ocasiona várias complicações, como corioamnionite, endometrite, infecção do trato urinário e de sítio cirúrgico (MERCER e BRIGGS, 1996).

Outro problema grave que pode ocorrer é o comprometimento da evolução da gestação e do feto, provocando aborto, morte fetal intrauterina, corioamnionite e ruptura de membrana coriônica, levando a parto prematuro, assim como induzindo significativo aumento de recém-nascidos com baixo peso e com infecções no período pós-parto, como

pneumonia, infecções cutâneas, ósseas ou articulares e meningite, o que pode causar retardo mental, além de perda de visão e audição nas crianças sobreviventes (CAIAFFA FILHO *et al.*, 1986).

A seguir, na Tabela 1, demonstra-se o número de óbitos de neonatos por ocorrência de afecções originadas no período perinatal.

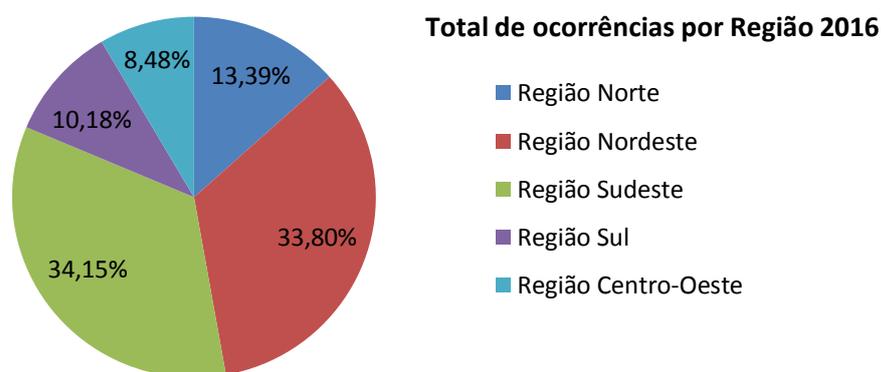
Tabela 1 Óbitos por ocorrência por Capítulo CID-10, segundo Região/Unidade da Federação, Capítulo CID-10: XVI. Algumas afecções originadas no período perinatal, faixa etária 1: 0 a 6 dias. Período: 2014 e 2016 (Fonte: MS/SVS/CGIAE – MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Datasus. 2014 e 2016)

Região/Unidade Federação	CAP XVI (2014)	CAP XVI (2016)
TOTAL	Total 16.033	Total 14.903
Região Norte	2.003	1.995
Rondônia	143	140
Acre	90	57
Amazonas	508	501
Roraima	61	62
Pará	944	991
Amapá	129	116
Tocantins	128	127
Região Nordeste	5.547	5.037
Maranhão	822	724
Piauí	372	354
Ceará	688	659
Rio Grande do Norte	304	239
Paraíba	332	282
Pernambuco	882	797
Alagoas	347	277
Sergipe	243	217
Bahia	1.557	1.488
Região Sudeste	5.509	5.090
Minas Gerais	1.278	1.205
Espírito Santo	259	238
Rio de Janeiro	1.201	1.111

São Paulo	2.771	2.536
Região Sul	1.657	1.517
Paraná	719	624
Santa Catarina	364	339
Rio Grande do Sul	574	554
Região Centro-Oeste	1.317	1.264
Mato Grosso do Sul	214	195
Mato Grosso	291	297
Goiás	468	473
Distrito Federal	344	299

Pode-se identificar que a região Nordeste e a região Sudeste possuem o maior número de ocorrências registradas de internações de neonato por infecção no período perinatal, que corresponde a 0-6 dias. Nesta análise, o CID10 não identifica a causa da infecção.

Figura 3 Gráfico de pizza com o total de ocorrências de óbitos por ocorrência por Região segundo Capítulo CID-10: XVI. Algumas afecções originadas no período perinatal Faixa etária 1: 0 a 6 dias Período: 2016



A seguir, na Tabela 2, vemos os dados dos SUS referentes aos óbitos por ocorrência do Capítulo CID-10, por septicemia bacteriana, do recém-nascido na faixa etária 1, de 0 a 6 dias, segundo Região/Unidade da Federação, no período de 2014.

Tabela 2 Óbitos por ocorrência por Capítulo CID-10, segundo Região/Unidade da Federação. Lista Mortalidade CID-10: Septicemia bacteriana do recém-nascido P36 Faixa etária 1: 0 a 6 dias. Período: 2014 e 2016 Total. (Fonte: MS/SVS/CGIAE – MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Datasus. 2014 e 2016).

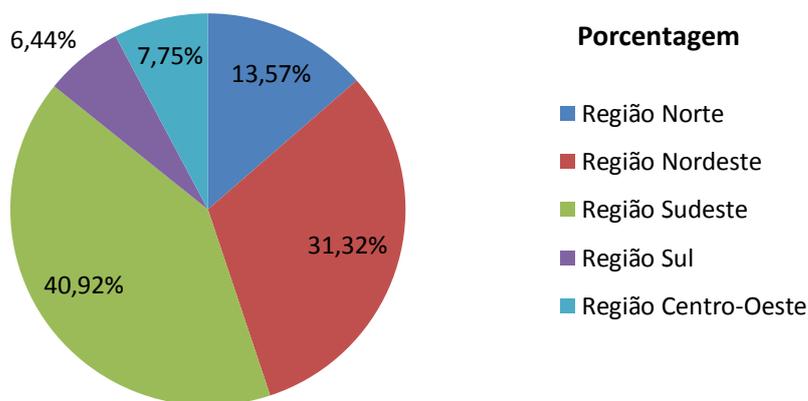
Região/Unidade da Federação	Cap XVI (2014) P36	Cap XVI (2016) P36
TOTAL	1.563	1.459
Região Norte	201	198
Rondônia	24	27
Acre	11	10
Amazonas	46	30
Roraima	8	5
Pará	86	95
Amapá	16	22
Tocantins	10	9
Região Nordeste	540	457
Maranhão	58	73
Piauí	12	17
Ceará	87	80
Rio Grande do Norte	49	24
Paraíba	39	34
Pernambuco	92	73
Alagoas	70	45
Sergipe	19	22
Bahia	114	89
Região Sudeste	595	597
Minas Gerais	135	144
Espírito Santo	23	20
Rio de Janeiro	151	152
São Paulo	286	281

Região Sul	117	94
Paraná	40	23
Santa Catarina	24	27
Rio Grande do Sul	53	44
Região Centro-Oeste	110	113
Mato Grosso do Sul	14	19
Mato Grosso	29	37
Goiás	44	36
Distrito Federal	23	21

Pode-se identificar que as regiões Nordeste e Sudeste possuem o maior número de ocorrências registradas de óbitos de neonato por septicemia bacteriana, no período perinatal que corresponde a 0-6 dias após o nascimento, correspondendo a 72,24% de todos os casos. Grande parte destas infecções corresponde à contaminação por GBS.

Para melhor visualização dos valores, segue figura 4 em forma de gráfico de pizza.

Figura 4 Óbitos infantis - Brasil Óbitos por Ocorrência por Região/Unidade da Federação e Região Capítulo CID-10: XVI. Algumas afecções originadas no período perinatal Categoria CID-10: P36 Septicemia bacteriana do recém-nascido Faixa etária 1: 0 a 6 dias Período: 2016



Na tabela 3, somamos o total de mortes de recém-nascidos por infecções bacterianas e septicemia, referente o ano 2016. Morreram 16.362 bebês (correspondendo a 0,57% do total de nascimento no Brasil) com maior incidência na região Norte do Brasil.

Conclui-se que, atualmente, mesmo com os métodos profiláticos existentes, o número de recém-nascidos infectados e mortos é alto. Além dos custos econômicos, facilmente calculáveis, como uso de antibióticos e internação hospitalar, há os custos emocionais e psicológicos das famílias, impossíveis de se mensurar.

Tabela 3 Total de mortes de recém-nascido no ano de 2016, por infecções originadas no período perinatal, incluindo sepse e infecções bacterianas.

Região	Óbitos de recém-nascidos em 2016 por infecção bacteriana	Óbito por região/Total	População Total por Região	Óbito/População total	Total de Registro de nascidos vivos 2016/2017
Região Norte	2.193	13,40%	12.342.627	0,0178%	288.946
Região Nordeste	5.494	33,58%	46.995.094	0,0117%	799.166
Região Sudeste	5.687	34,76%	70.190.565	0,0081%	1.145.937
Região Sul	1.611	9,85%	24.546.983	0,0066%	397.466
Região Centro-Oeste	1.377	8,42%	11.296.224	0,0122%	242.951
Total	16.362	100,00%	165.371.493	0,0099%	2.874.466
Mortes por infecção bacteriana					0,57%

Logo, vê-se a importância de se desenvolverem terapias preventivas de imunização e de se evitarem, assim, os diversos problemas diretos e indiretos descritos (MOROZUMI *et al.*, 2015).

2.7 Prevenção atual contra o *Streptococcus agalactiae*

Atualmente, existem duas estratégias utilizadas no Brasil para a prevenção do *Streptococcus agalactiae* (COSTA, 2011): (1) antissepsia do canal de parto com gluconato de clorexedina e (2) antibiótico profilaxia intraparto (AIP).

No entanto, ambas as estratégias apresentam riscos para o recém-nascido e para a mãe, sendo então a imunização preventiva uma alternativa positiva para evitar a contaminação dos neonatos e as possíveis consequências.

A Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo já tem regulamentação para identificação e prevenção neonatal do GBS. O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) está disponível para consulta no *site* do Ministério da Saúde e faz parte do protocolo obrigatório a ser seguido pelos médicos durante a gestação. O método

de rastreamento é baseado na cultura de secreções vaginal e retal colhidas por *swab*, entre a 35.^a e a 37.^a semanas de gestação para todas as gestantes.

Como estratégia para prevenção, faz-se a antissepsia do canal de parto, utilizando-se o gluconato de clorexidina 0,2% como antisséptico na prática hospitalar, tendo excelente ação sobre germes gram-positivos, boa ação residual e baixa toxicidade. O uso de irrigação vaginal com clorexidina, no início do trabalho de parto e a cada 6 horas, é benéfico na diminuição da colonização do *Streptococcus agalactiae*, tratando-se de uma medida prática, simples e de baixo custo, podendo ser usada ou considerada como coadjuvante da AIP.

Contudo, a prática da antissepsia do canal do parto possui algumas desvantagens. Quando associada a um sabonete, por exemplo, pode causar toxicidade local e alteração na flora normal da pele, de modo que haja maior predisposição à colonização por bactérias gram-negativas; além disso, o contato de soluções com altas concentrações de clorexidina com os olhos e tecidos sensíveis pode causar irritação. Há registros, na literatura especializada, de recém-nascido que desenvolveram cianose e bradicardia. A clorexidina pode causar alergias e irritações no local onde for aplicada. A concentração correta também é um fator essencial para que seja considerada segura para aplicação sobre peles e mucosas, evitando, assim, alergias ou desenvolvimento de microrganismos resistentes aos antissépticos (FIORENTINO, 2009). Importante frisar, por fim, que o uso de clorexidina é uma estratégia de contenção da infecção e não é considerada efetiva na eliminação dos microrganismos.

A antibioticoprofilaxia intraparto (AIP) é a administração de antibiótico logo após o início do trabalho de parto ou da ruptura da bolsa fetal, sendo necessárias pelo menos duas doses de antibióticos com intervalo de 4 horas, antes da resolução do parto, para que menor porcentagem de recém-nascidos seja colonizada pelo *Streptococcus agalactiae* no momento do nascimento. A estratégia de antibioticoprofilaxia intraparto (AIP) reduz a incidência de GBS neonatal de início precoce (EOD, definido como doença com aproximadamente <7 dias de idade), mas não tem impacto na infecção por GBS de início tardio (LOD, 7-90 dias de idade) e apenas impacto limitado sobre a doença em mulheres grávidas (HEATH, 2016).

Estudos mostraram que o tratamento com antibióticos durante o pré-natal não previne a infecção neonatal e grande parte das gestantes tratadas apresentava-se recolonizada no momento do parto. Portanto, não existe qualquer vantagem em se tratar a gestante colonizada pelo *Streptococcus agalactiae* antes do parto (BOTELHO, 2018). A

AIP inclui penicilina, ampicilina ou cefazolina nas doses recomendadas. A quimioprofilaxia intraparto deve ser intravenosa com penicilina (5.000.000 U inicialmente e, após, 2.500.000 U a cada 4 horas, até o nascimento) ou ampicilina (2 g inicialmente e, após, 1 g a cada 4 horas até o nascimento). Se a gestante é alérgica à penicilina, mas sem risco de anafilaxia, pode ser usada a cefazolina 2 g, inicialmente, seguida de 1 g a cada 8 horas até o parto. Caso haja risco de anafilaxia, são indicados 900 mg de clindamicina a cada 8 horas ou eritromicina 500 g a cada 6 horas até o nascimento. Deve-se usar vancomicina naqueles casos em que o *Streptococcus agalactiae* é resistente aos antibióticos citados.

A eficácia dessa profilaxia, realizada no período intraparto, é estimada em torno de 25% a 30% dos casos, reduzindo a mortalidade em 10%. A utilização de antimicrobianos antes do trabalho de parto ou da ruptura prematura das membranas ovulares não se mostrou eficaz. A colonização materna pode ser reduzida por esse método, mas a chance de recidiva mostrou-se elevada. A única exceção para iniciar o tratamento durante a gestação é a existência de infecção urinária por GBS (SUS, 2010).

A quimioprofilaxia ainda é o melhor tratamento existente no combate ao *Streptococcus agalactiae*. O uso adequado de antimicrobiano no momento intraparto ou no período de latência do trabalho de parto prematuro é um fator primordial para que seja mais efetivo.

Como desvantagens na aplicação da AIP, deve-se observar que o uso eventualmente abusivo de antibióticos, principalmente em recém-nascidos, causa o aumento de resistência frente aos antimicrobianos. O uso dos antibióticos também possui outras desvantagens, como exposição do neonato à toxicidade desses agentes, cujas consequências podem ser:

- ampicilina/penicilina: leucopenia, neutropenia, eosinofilia, febre
- gentamicina/amicacina: ototoxicidade, nefrotoxicidade, bloqueio neuromuscular em infusões rápidas
- cefotaxima: eosinofilia, neutropenia

Além dos fatos anteriormente descritos, de acordo com Mathew (2004), os antibióticos podem causar também três potenciais problemas na microbiota dos lactentes:

- 1º. modificar a flora e alterar os mecanismos de defesa do intestino – e isso pode resultar em diarreia e má absorção de nutrientes;
- 2º. aumentar a toxicidade pelo número excessivo de doses administradas, visto que a duração do trabalho de parto pode variar consideravelmente;

3°. alterar e interferir na microbiota (MATHEW, 2004) do recém-nascido, o que é frequentemente ignorado. A microbiota intacta o protege de diversas infecções. A alteração de sua integridade pelo uso de antibióticos propicia maior predisposição a infecções diversas e diminuição da atividade do sistema imunológico.

Outro fator restritivo é a importância cada vez maior de uso racional dos antibióticos, pois o contrário, ou seja, o uso incorreto deles, tem colaborado para a ocorrência de resistência bacteriana e o aumento da capacidade adaptativa desses microrganismos às diversas classes farmacológicas, dificultando o tratamento (DUTRA *et al.*, 2014; MALEK-JAFARIAN *et al.*, 2015; ADAMS *et al.*, 2015). As situações mais comuns de uso incorreto dos antibióticos são ocorrência de febre, dor de garganta e diarreia. Estas manifestações clínicas, geralmente, resultam de infecções virais e os antibióticos não atuam na erradicação de vírus. O uso de antibióticos em infecções não bacterianas resulta somente na destruição de algumas bactérias sensíveis e, por outro lado, provoca uma seletiva proliferação de bactérias resistentes (AIZENSTEIN, 2017; EMANEINI *et al.*, 2014; MALEK-JAFARIAN *et al.*, 2015).

Berardi e Ferrari (2015) levantam outras preocupações nos casos de administração de antibióticos e a duração inadequada (<4 horas) do AIP antes do parto, como, por exemplo: uma mulher com pontuação de Bishop <5 pode ser exposta desnecessariamente a várias doses de antibióticos até o parto, pois há evidências de que os níveis de bactericidas de antibióticos b-lactâmicos no sangue fetal são alcançados nos primeiros 3 minutos e que os níveis que excedem de 10 a 179 vezes a concentração inibidora mínima para o GBS persistem por até 2 horas. Os estudos fornecem também fortes evidências de ação rápida da ampicilina dentro do líquido amniótico, embora os estudos não forneçam evidência firme em relação ao tempo necessário para garantir a eficácia.

Estudos de Ahmadzia e Heine (2014) levantam questões sobre o protocolo de AIP, pois algumas evidências sugerem que períodos mais curtos do que 4 horas podem ser suficientes. Scasso *et al.* (2015) também questionam o protocolo atual de AIP, pois, de acordo com esses pesquisadores, as primeiras 2 horas de AIP se mostraram suficientes para que a cultura se tornasse negativa para 53% das mulheres que tomaram antibiótico. As concentrações de penicilina G foram medidas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. As amostras foram obtidas a partir do sangue do cordão umbilical, em todos os casos, e de líquido amniótico obtido de pacientes que tiveram parto por

cesariana. Entre as 60 participantes, 43 (72%) tinham uma amostra rectovaginal positiva antes de AIP. Destas mulheres, 23 (53%) apresentaram cultura negativa após 2 horas. Após 4 horas, apenas 5 (12%) mantiveram-se positivas para GBS. A concentração de penicilina G no sangue e no fluido amniótico estava acima da concentração inibitória mínima (0,12 ug/ml) em todos os casos. Os autores concluíram que: quatro horas de AIP foram suficientes para reduzir o número de mulheres com culturas positivas para GBS e atingir a eficácia global deste tratamento. Para os autores, a profilaxia com antibióticos parece ser eficaz em curtos períodos. Estes novos estudos divergem dos atuais PCDT (Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas) adotados no Brasil, nos quais as doses de antibióticos (no mínimo duas doses) são ministradas a cada 4 horas.

Logo, conclui-se que, apesar de a quimioprofilaxia ser a melhor estratégia no combate ao *Streptococcus agalactiae*, ainda apresenta grandes desvantagens que poderiam ser diminuídas com o uso de uma vacina preventiva (AHMADZIA; HEINE 2014; LIÉBANA-MARTOS *et al.*, 2015). Para Costa (2011), as duas estratégias atualmente utilizadas, no Brasil, são consideradas paliativas e pouco eficientes na contenção da infecção.

2.8 Sistema imunológico

Propriedades Gerais

A função do sistema imunológico é defender os seres vivos contra agentes infecciosos e protegê-los de uma diversidade de elementos estranhos (figura 5), como microrganismos patogênicos, vírus, toxinas e substâncias alergênicas (ABBAS *et al.*, 2015). Qualquer substância capaz de induzir uma resposta imunológica nos seres humanos ou em outros animais é denominada imunógeno.

Figura 5 Detalhamento da função do sistema imunológico como sistema de defesa contra agentes infecciosos.



O sistema imunológico de um indivíduo começa a se formar na fase intrauterina, quando recebe anticorpos da mãe, via placenta. Após o nascimento, o leite materno passa a ser a principal fonte de anticorpos da criança, até que ela consiga produzir seus próprios anticorpos em resposta ao contato com agentes infecciosos ou à administração de vacinas.

O sistema imune geralmente é classificado em dois mecanismos de resposta: sistema imune inato e sistema imune adaptativo (tabela 4 abaixo).

Tabela 4 As barreiras imunológicas naturais, diferenciação da imunidade inata e adaptativa (Turvey e Broide, 2010).

Barreiras Naturais	Imunidade Inata (inespecífica)	Imunidade adaptativa (específica)
Constituídas pela integridade da pele, mucosas , por substâncias antimicrobianas presentes nestes locais, pH das secreções do trato digestivo e urogenital, enzimas antimicrobianas presentes na lágrima, entre outros, naturalmente servem de barreira impedindo a entrada de micro-organismos em nosso organismo.	O organismo responde sempre da mesma forma, independente do antígeno (varia só a quantidade) Componentes da resposta inespecífica: 1. Barreira mecânica 2. Fagócitos: fagocitose e quimiotaxia 3. Sistema complemento 4. Células NK	O organismo reage de diferentes formas, dependendo do antígeno (varia a qualidade) Características 1. Memória 2. Especificidade 3. Heterogeneidade Componentes: 1. Resposta Humoral (linfócitos B) 2. Resposta celular (linfócitos T)
Ao ultrapassar as barreiras naturais impostas por essa primeira linha de defesa, o próximo mecanismo de defesa do organismo humano é a imunidade inata.	Composta basicamente por células que realizam fagocitose e por substâncias como as proteínas do sistema complemento , que são responsáveis por destruir a membrana de agentes infecciosos, auxiliar no processo de fagocitose e também intensificar o processo inflamatório. Após algumas horas da infecção, começa a se estabelecer a terceira categoria de mecanismos de proteção anti-infecção, a imunidade específica .	Caracterizada pelo envolvimento de células chamadas linfócitos T e B, pela produção de anticorpos e pelo desenvolvimento da memória imunológica. Responsável por gerar uma reação rápida, intensa e específica num próximo contato com o mesmo micro-organismo.

A exposição do sistema imune a antígenos estranhos leva a ativação de uma resposta imunológica que varia quantitativamente e qualitativamente. Alguns fatores influenciam na resposta: os antígenos quimicamente diferentes estimulam diferentes tipos de respostas imunes; a quantidade de antígeno a qual um indivíduo se expõe influencia a potência da resposta imune gerada; a rota de entrada pode induzir irresponsividade específica; o número de células acessórias, como macrófagos, linfócitos B e as células dendríticas, é essencial para a indução de respostas imunes dependentes dos linfócitos T e sua ausência leva a respostas deficientes. O perfil de linfócitos antígeno-específicos estimulados pela imunização varia de acordo com o antígeno: viral, bacteriano extracelular e intracelular (ABBAS *et al.*, 2015).

Para se estudar os tipos de resposta imunológica, subdivide-se em: primária e secundária; ativa e passiva, inata e adaptativa, humoral e celular (tabela 5).

Tabela 5 Classificação dos tipos de resposta imunológica.



Resposta Primária: é a resposta imunológica que ocorre quando o organismo entra em contato pela primeira vez com o antígeno; ativação do sistema macrofágico; ativação do sistema linfóide (formação de células de memória T e células B); e formação de imunoglobulinas IgM.

Resposta Secundária: é a resposta imunológica em que já houve contato prévio com o antígeno; ativação do sistema macrofágico; ativação do sistema linfóide (já

presentes células de memória T e células B IgG); resposta mais rápida e mais intensa (proposta das vacinas).

A **imunidade ativa** é também subdividida em natural ou artificial, sendo natural a adquirida a partir do contato com um patógeno e a artificial pela vacinação. A vacina gera memória imunológica, a qual é traduzida por proteção de longa duração. A imunidade passiva também pode ser natural ou artificial, sendo a natural obtida pelo aleitamento materno (anticorpos transplacentários IgG e anticorpos no colostro IgA).

A **imunidade passiva** é artificial, obtida pela transferência ao indivíduo de anticorpos produzidos por um animal ou outro ser humano imune (aplicação de imunoglobulina). Esse tipo de imunidade produz rápida e eficiente proteção, que, contudo, é temporária, durando em média poucas semanas ou meses; exemplo: antitoxinas, gamaglobulinas humana, no caso de endemias de sarampo, e hepatite A para populações com deficiência de IgG.

Imunidade Inata: tem como principal função controlar as infecções, de maneira inespecífica, antes que a imunidade adquirida se desenvolva, ou seja, refere-se a qualquer resistência naturalmente presente quando um patógeno se apresenta pela primeira vez; não requer nenhuma exposição anterior e não se modifica significativamente por meio de exposições repetidas ao patógeno durante a vida do indivíduo. Os agentes atuantes da imunidade natural, inata são: células fagocitárias, células “*natural killers*” e o sistema complemento.

Imunidade adaptativa (específica): a principal função do sistema imunológico adaptativo é prevenir ou limitar a infecção causada por microrganismos, sendo que essa ação é dada a partir de dois ramos, os mediados por células imunes e por anticorpos. Imunidade por células consiste principalmente nos linfócitos T (auxiliares e citotóxicos), enquanto o mediado por anticorpos (resposta imune humoral) consiste em desenvolvimento dos linfócitos B e das células plasmáticas. Caracterizada por especificidade e memória.

Imunidade humoral – mediada pelos linfócitos B com secreção de anticorpos para o reconhecimento específico e eliminação dos antígenos. O sistema humoral tem capacidade de responder a diferentes tipos de antígenos, produzindo classes de anticorpos diversos.

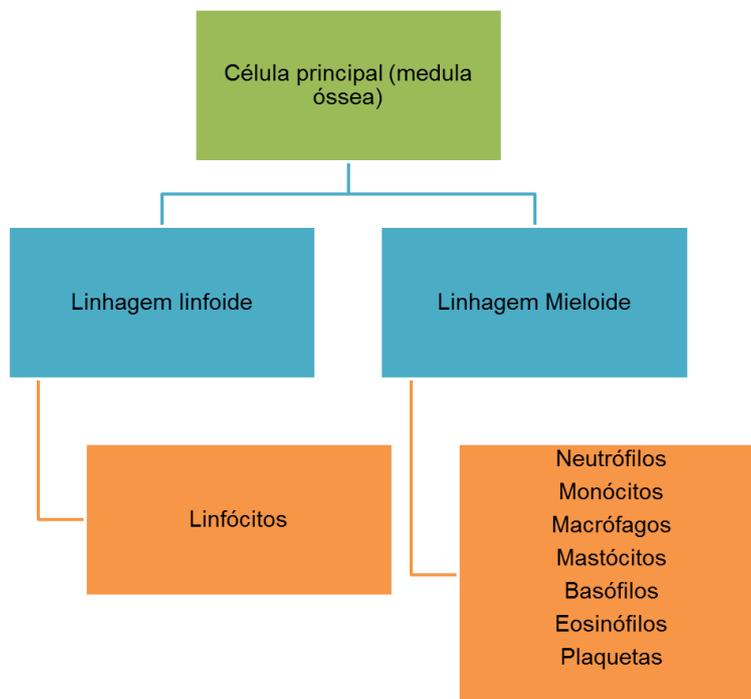
Imunidade celular – mediada por linfócitos T para ativação do macrófago ou lise da célula infectada.

A eliminação de antígenos, mediada por anticorpos, envolve mecanismos efetores que requerem a participação de vários componentes humorais e celulares. As respostas imunes humorais e celulares contra os antígenos devem possuir características fundamentais: especificidade para antígenos distintos, diversidade de reconhecimento e memória para exposição ao antígeno, autorregulação e capacidade de discriminar entre antígenos próprios e não próprios (ABBAS *et al.*, 2015).

Células do sistema imune

Praticamente todas as células de defesa especializadas possuem dois aspectos em comum: (1) todas passam pelo menos parte de suas vidas na corrente sanguínea e (2) todas se originam de células produzidas na medula óssea (figura 6).

Figura 6 Produção de células do sistema imune



Os linfócitos estão divididos em dois subtipos, linfócitos B e linfócitos T, presentes no sangue numa relação aproximada de 1:5. Apresentam funções distintas; os linfócitos B têm como papel principal o reconhecimento dos antígenos e são produtores de anticorpos (ABBAS *et al.*, 2015). Os linfócitos T são os responsáveis por reconhecer o “próprio” e o “não próprio” (tecidos estranhos e agentes infecciosos), não são capazes de

produzir anticorpos por si mesmo, embora deem importante contribuição à função dos linfócitos B.

Imunidade contra bactérias extracelulares

A interação do sistema imune com microrganismos infecciosos é uma interação dinâmica (ABBAS *et al.*, 2015), sendo que o sistema imunológico é um sistema sensorial baseado em estímulos internos e externos (BRODIN e DAVIS, 2017). Semelhantemente a outros sistemas sensoriais, as células do sistema imunológico devem adaptar-se às entradas recebidas para manter sua capacidade de resposta às mudanças relativas e não absolutas. Assim, mudanças adaptativas induzidas por influências ambientais são importantes na modelagem da composição e da função do sistema imunológico de um indivíduo. Para Brodin e Davis (2017), o sistema imunológico humano varia em consequência de influências hereditárias e não hereditárias (como infecções e vacinas), mas a maior parte dessa variação é explicada pela influência dos micróbios simbióticos e patogênicos.

A microbiota composta de muitos microrganismos tem papel importante na formação do sistema imunológico humano. Exposições a diferentes cepas de bactérias portadoras de diferentes versões de endotoxina podem exercer diferentes influências no desenvolvimento do sistema imunológico, o que poderia explicar algumas das diferenças marcantes na incidência de doenças imunomediadas observadas entre diferentes populações. Além do efeito da endotoxina (componentes das paredes celulares bacterianas) e das exotoxinas (ativamente secretadas pelas bactérias) como responsáveis por grande número de infecções, a disbiose microbiana (definida como um desequilíbrio entre espécies específicas no microbioma colonizador) tem sido associada ao aumento do risco de asma e outras doenças, sugerindo uma perturbação do sistema imunológico (ABBAS *et al.*, 2015).

Bactérias gram-positivas apresentam parede celular espessa, não sendo sujeitas a lise direta pelo sistema complemento. Para Bricks (1994), a proteção contra estreptococos gram-positivos pode ser conferida pela produção de anticorpos sorotipos específicos contra a cápsula, que agem como opsoninas, aumentando a lise celular pela via clássica do complemento, levando à morte da bactéria.

O GBS é uma bactéria extracelular, capaz de se replicar fora das células do hospedeiro, como na circulação, nos tecidos conjuntivos e em vários espaços teciduais, como sistema gastrointestinal. A infecção por GBS causa doenças por dois mecanismos

principais: (1) indução de reação inflamatória, que destrói tecido no local da infecção, e (2) produção de toxinas, como as endotoxinas, componentes das paredes celulares bacterianas, e exotoxinas, ativamente secretadas pelas bactérias. Um dos componentes mais imunogênicos das paredes celulares são os polissacarídeos. A imunidade humoral é a principal resposta imune-específica protetora contra bactérias extracelulares. A principal resposta dos linfócitos T às bactérias extracelulares consiste de linfócitos T CD4+ reativos a antígenos proteicos em associação a moléculas da classe II do complexo de histocompatibilidade principal (MHC).

Para o desenvolvimento de uma vacina, faz-se necessário identificar e isolar o patógeno associado a uma doença, para posteriormente avaliar sua parte específica que induz uma resposta imune. Como todo patógeno é diferente, estudos sobre os tipos de resposta imunológica são necessários, por exemplo: quais os componentes imunogênicos, fazer uma avaliação de riscos, tipo de imunidade e outros fatores que promovem a resposta imune no corpo, pois o processo de desenvolvimento deve ser específico para cada necessidade (tabela 6).

Tabela 6 Diferenças entre vários tipos de vacinas (GSK vacinas)

Característica	Vacina não viva, polissacarídica.	Vacina não viva, proteica ou glicoconjugada.	Vacina viral viva.
Tipo de imunidade	Timo-independente.	Estimula a imunidade tímica, com produção de linfócitos CD4+.	Estimula a imunidade tímica, com produção de linfócitos CD4+ e CD8+.
Memória	Não, ou mínima.	Sim, mas necessita de reforços.	Sim, imunidade por toda a vida.
Número de doses	Em geral, aplicam-se em dose única, pois a resposta imunológica não aumenta com a repetição.	Várias doses e reforços.	Em princípio, dose única.
Riscos para imunodeprimidos	Não	Não	Sim
Possibilidade de reversão à virulência	Não	Não	Sim
Termoestabilidade	Mais estáveis.	Mais estáveis.	Menos estáveis.

2.9 Imunidade de mucosa

O aparelho imunológico pode ser dividido em dois compartimentos: (1) o sistêmico, incluindo medula óssea, baço e gânglios linfáticos, e (2) de mucosa, que compreende o tecido linfoide associado às superfícies de mucosa e glândulas secretoras (STAATS *et al.*, 1994). Cada compartimento está associado tanto a uma resposta celular quanto a uma resposta humoral, porém a natureza das respostas imunes difere em cada compartimento.

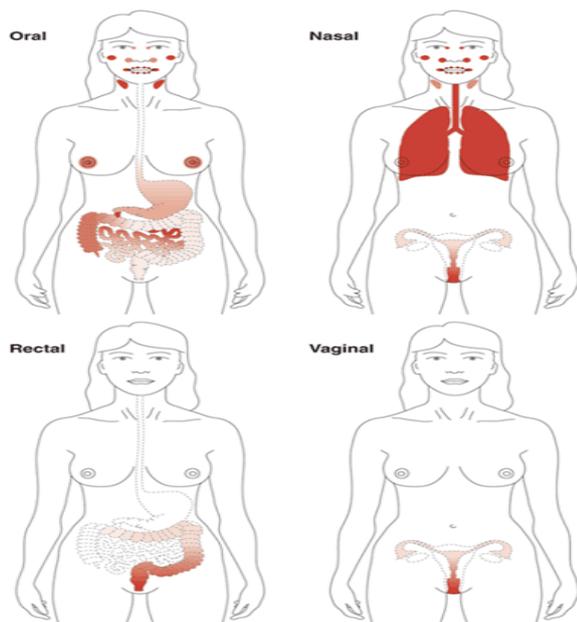
Os anticorpos do compartimento sistêmico são principalmente do grupo das imunoglobulinas G (IgG), que têm como função principal neutralizar patógenos no sistema circulatório. Em contrapartida, os anticorpos na mucosa, com a função de impedir a entrada de patógenos no organismo, são, principalmente, as imunoglobulinas A secretoras (sIgA), são predominantes na saliva, na lágrima, no leite e em mucosas dos tratos gastrointestinal, respiratório e genitourinário (JÓNSDÓTTIR, 2007; MCCLUSKIE e DAVIS, 1999). O papel das sIgA nas mucosas tem sido identificado no processo inflamatório bem como na inibição da aderência bacteriana e, também, na neutralização de vírus, toxinas e enzimas. Essas ações locais podem servir para minimizar a entrada de microrganismos e de seus produtos no compartimento interno do hospedeiro, prevenindo a lesão de tecidos e órgãos internos (SANTAMARIA, 2011).

As superfícies de mucosa estão constantemente expostas ao meio ambiente, sendo as principais portas de entrada de microrganismos (ÇUBURU *et al.*, 2007). As mucosas recobrem os tratos urogenital, digestivo, óptico e respiratório e possuem barreiras físicas e químicas capazes de degradar e repelir grande parte dos patógenos (HOLMGREN e CZERKINSKY, 2005). Além dessas barreiras, as superfícies da mucosa são imunologicamente ativas: a defesa é reforçada pelas respostas inata e adaptativa, o que evita a colonização, a invasão pelos microrganismos nocivos e limita a propagação dos patógenos (BRANDTZAEG, 2007).

Os antígenos são reconhecidos, nos locais indutores do sistema imune, ao entrarem em contato com as mucosas; são endocitados e apresentados às células B e T (linfócitos T e B) e, nos locais efetores, o anticorpo contra o antígeno-alvo é secretado (MCCLUSKIE e DAVIS, 1999). O antígeno ativa o sistema imunológico inato inicialmente, ou seja, o reconhecimento de características gerais de grupos de microrganismos. Posteriormente, a imunidade adaptativa ou adquirida é ativada, havendo o reconhecimento de características específicas do antígeno estranho.

Para Holmgren e Czerkinsky (2005), a imunização da mucosa nasal estimula resposta imunitária no trato respiratório e, também, pode dar origem à resposta imunitária na mucosa genital-vaginal (figura 7).

Figura 7 A imunização da mucosa nasal estimula resposta imune no trato respiratório e, também, pode dar origem à forte resposta imunológica da mucosa genital-vaginal. Sombreamento indica força de resposta (Holmgren e Czerkinsky (2005)).



Para Wheeler e Sharif (1996) e Çuburu *et al.* (2007), as moléculas entregues via sublingual atravessam o epitélio escamoso, a membrana basal e a lâmina própria, em vários locais da boca, e, através das veias, são transportadas para a circulação sistêmica, induzindo resposta imune de mucosa e sistêmica. Diante dessas análises, a via sublingual mostra grande potencial para imunização.

As possíveis vias de administração de mucosa apresentam inúmeras vantagens, como: possibilidade de neutralização dos patógenos na sua porta de entrada; menor exigência de qualificação de pessoas para administração da vacina; maior aceitação dos pacientes. Além disso, uma vez que não se trata de um método invasivo (VAN DER LUBBEN *et al.*, 2001), possui maior facilidade e rapidez na administração, principalmente se for necessária vacinação em massa, bem como resulta em diminuição dos riscos de injúrias e de contaminação cruzada (PRATELLI *et al.*, 2001).

Vacinas de mucosa, que são aplicadas diretamente em superfícies com essa característica, resultam em melhor iniciação de resposta imune humoral e mediada por

células, quando em comparação com vacinas parenterais. Isso porque há direcionamento e indução de mecanismos imunológicos em locais específicos dos tecidos linfoides associados à mucosa (MALT), os quais são, então, capazes de induzir resposta imune tanto local quanto sistêmica (DIETRICH *et al.*, 2003). Já as vacinas parenterais são, geralmente, adequadas para prevenir doenças sistêmicas causadas por patógenos invasivos, pois sua habilidade em induzir resposta na mucosa é bastante limitada (OIEN *et al.*, 1994).

Os pesquisadores Baker e colaboradores (2017) investigaram estratégias de imunização; seus resultados sustentam que a imunidade humoral induz uma menor colonização de GBS do trato genital feminino e a vacinação de mucosas poderia controlar a colonização patogênica. Os camundongos deficientes em células B ou aqueles que não possuem receptor Fc neonatal, que é um mediador do transporte de IgG para a mucosa vaginal, apresentam colonização vaginal prolongada por GBS em comparação com animais de tipo convencionais. A depuração induzida por vacinação com GBS foi específica do sorotipo, sugerindo um papel para os anticorpos anticápsulas na proteção.

Baker e Kasper (1976) estudaram o papel do anticorpo materno na infecção estreptocócica neonatal do Grupo B com um ensaio de ligação ao antígeno radioativo empregando um antígeno de polissacarídeo purificado com determinantes do Tipo III do Grupo B. Os resultados sugerem que a transferência transplacentária de anticorpos maternos protege os bebês da infecção estreptocócica invasiva com cepas de Tipo III.

Para Brandtzaeg (2010), a exclusão imunológica dos antígenos é realizada principalmente pela IgA secretora em cooperação com as defesas inatas; assim, os anticorpos do leite materno são direcionados contra agentes infecciosos e outros antígenos exógenos no ambiente da mãe, que são aqueles que podem ser encontrados pelo recém-nascido, representando a amamentação uma perfeita integração imunológica entre mãe e filho.

Conclui-se que a imunização contra o *Streptococcus agalactiae* via vacina de mucosas é uma estratégia bastante promissora para indução de anticorpos soro-específicos da cápsula polissacarídica desse microrganismo. Ela tem a vantagem de prevenir as formas precoce e tardia da doença, eliminando a necessidade de triagem através de culturas com 35-37 semanas de gestação para *Streptococcus agalactiae* e a quimioprofilaxia.

2.10 Vacinação de gestantes

A vacinação em gestantes tem como principal intenção proteger a mãe contra doenças infecciosas e, também, o seu feto, com anticorpos maternos que serão transferidos através da placenta durante a segunda metade da gravidez. Além disso, mães vacinadas durante a gravidez são menos susceptíveis de transmitir uma infecção aos neonatos após o parto, devido aos jovens lactentes possuírem seus sistemas imunitários imaturos e, conseqüentemente, mais vulneráveis às doenças infecciosas e, muitas vezes, incapazes de desenvolver uma resposta imune às vacinas (RASMUSSEN *et al.*, 2014).

Num ensaio clínico randomizado, em Bangladesh, com a vacina de gripe em mulheres gestantes, foi observado que a vacinação de gestantes preveniu a influenza nos recém-nascidos (ZAMAN *et al.*, 2008). Logo, a imunização materna tem grande potencial de prevenir doenças e, conseqüentemente, a morte de recém-nascidos, bem como de suas mães (United Nations Children's Fund - UNICEF, 2013).

As novas tecnologias, principalmente as livre de agulhas (*needle-free*), além de aumentarem a cobertura vacinal, por diminuição do medo e da tensão, diminuem o risco de contaminação cruzada e o acúmulo de resíduos na área de saúde. Neste sentido, as imunizações de mucosa (intranasal por *spray*, atomizadores e inaladores); intradérmicas; implantes sólidos; microagulhas sólidas, ocas e absorvíveis; injetores por ar comprimido intradérmicos descartáveis e eletroporação podem reduzir tanto o custo para o sistema de saúde como melhorar a eficácia. Os riscos associados à imunização vacinal em gestantes seriam abortamento, natimorto e malformações congênitas como cardiopatia, catarata e surdez. A imunização de mucosas, por gerar uma resposta inflamatória menor que a imunização via injetável, diminuiria a ocorrência destes riscos. O desenvolvimento destas novas tecnologias para gestantes, para a prevenção de doenças infecciosas ou para imunoterapia de doenças autoimunes, prevenção de doenças inflamatórias alérgicas ou infecciosas, exigirá acesso aos sistemas de distribuição de antígenos que podem ajudar a apresentar eficientemente os "antígenos protetores" ao sistema imune da mucosa e promover e direcionar a resposta imune da mucosa ao efeito desejado (HOLMGREN e CZERKINSKY, 2005). Neste caso, o estudo sobre Nanopartículas, e sua utilização como carreadores de antígeno, torna-se um fator decisivo para o desenvolvimento de novos fármacos.

2.11 Nanopartículas de quitosana para carregamento de antígenos

A quitosana (QS) é considerada um biopolímero policatiônico degradável, não tóxico, que consiste de unidades de β -(1,4)-2-amino-2-desoxi-D-glicose derivadas da desacetilação de quitina, sendo o principal componente das cutículas protetoras de crustáceos, incluindo caranguejos, camarões, lagostas e parede celular de alguns fungos (PEI, 2017; PRABAHARAN, 2008; BORGES *et al.*, 2007; AGNIHOTRI *et al.*, 2004).

Esse polímero pode ser encontrado em uma variedade de formas, diferenciadas por peso molecular e por grau de desacetilação, que influenciarão no produto final desejado.

Nos últimos anos, transportadores solúveis e particulados com base no polímero mucoadesivo de quitosana ganharam espaço para entrega de proteínas pelas vias de mucosa (LASKAR, 2017; AMIDI *et al.*, 2010; ABDULACK-LOPES, 2012; SALDAÑA GONZALES, 2015; YOSHIDA, 2012). As nanopartículas de quitosana possuem excelente propriedade mucoadesiva sublingual e podem ser utilizadas, de maneira eficiente, como matriz polimérica para carregamento e disponibilização do antígeno à mucosa. A capacidade do polímero de quitosana de adesão aumenta sua capacidade de penetração nas moléculas, abrindo caminho entre as células da junção epitelial (AMIDI *et al.*, 2010).

Como adicional vantagem para desenvolvimento, a quitosana é classificada como uma substância bioativa e isenta da obrigatoriedade de registro, de acordo com as normativas da ANVISA, sendo assim um produto seguro para ser utilizado como polímero de encapsulamento, uma vez que suas propriedades funcionais já foram aprovadas.

Para a formulação de Nanopartícula de quitosana, utiliza-se o composto TPP (tripolifosfato de sódio – composto inorgânico) de fórmula molecular $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ que se apresenta comercialmente no estado sólido, em forma de um pó branco (RASKOVIĆ, 2007). É um poliânion a ser utilizado juntamente com a quitosana para a formulação de nanopartículas, sendo um composto não tóxico que, através de forças eletrostáticas, interage com a quitosana e forma redes iônicas reticuladas, através do método de gelificação iônica, no qual a presença de tripolifosfato de sódio serve como reticulador (ALI *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2011; MORRIS *et al.*, 2011).

A habilidade da Nanopartícula de quitosana (QS) em formar nanopartículas, sistemas poliméricos coloidais com partículas menores que um micrômetro (ABDELWAHED *et al.*, 2006; DESAI *et al.*, 1997), tem atraído grande interesse,

principalmente na área médica, para distribuição de vacinas, genes e antioxidantes (PEI, 2017; TSAI *et al.*, 2011). Além disso, a capacidade da Nanopartícula de incorporar e aderir são vantagens adicionais a este sistema (TSAI *et al.*, 2011; CSABA *et al.*, 2009; GAN e WANG, 2007).

Essa particularidade das nanopartículas de QS, de aderirem à superfície das mucosas, é uma característica vantajosa de fornecimento de antígenos via mucosas nasal, oral, sublingual, vaginal e pulmonar; além disso, as nanopartículas são capazes de aumentar a penetração das moléculas, abrindo caminho entre as células da junção epitelial (AMIDI *et al.*, 2010).

As nanopartículas de quitosana constituem uma membrana ou matriz sólida constituída de polímeros, no qual o antígeno é agregado, encapsulado ou adsorvido às partículas para, depois, serem fagocitadas e, posteriormente, liberadas gradualmente no fagolisossoma.

A via sublingual é uma alternativa para a administração do antígeno, pois a cavidade bucal é extremamente irrigada, com presença de linfonodos e secreção de anticorpos pela saliva.

2.12 Vacinas polissacarídicas

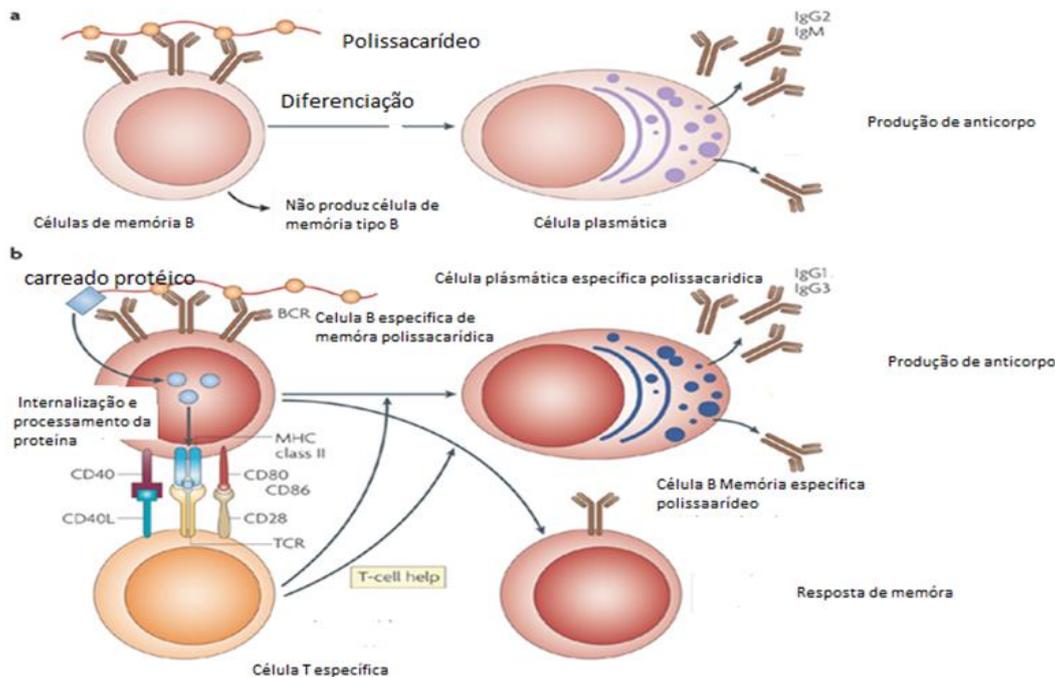
Os polissacarídeos bacterianos são pouco imunogênicos, mas são responsáveis pela antigenicidade. A cápsula polissacarídica do GBS é o maior fator de virulência, sendo o principal alvo para o desenvolvimento de uma vacina (TONIOLO *et al.*, 2015).

Como os polissacarídeos constituem-se em antígenos vacinais com eficácia limitada, por serem um antígeno célula T independente, e não estimularem a formação de células de memória, em 1929, os pesquisadores Avery e Goebel (1929) mostraram que a imunogenicidade podia ser aumentada pela ligação química com uma proteína carreadora (vacina conjugada). Em 1987, foi licenciada a primeira vacina conjugada para *Hemophilus influenza* (cápsula polissacarídica e toxóide tetânica – Hib.). A partir disso, muitos estudos têm sido conduzidos, em busca de vacinas com maior segurança, eficácia e rentabilidade (vacinas contra meningites e pneumococos). A conjugação do polissacarídeo com uma proteína carreadora aumenta a imunogenicidade e induz memória imunológica, estimulando a proteção de longa duração e a produção de anticorpos IgG de alta afinidade.

Para obtenção de anticorpos contra polissacarídeos, as vacinas conjugadas atendem ao princípio do mecanismo imunológico de cooperação entre linfócitos T e B

(Figura 8). Este processo de cooperação inicia-se com o reconhecimento, pelo linfócito B, do polissacarídeo da molécula conjugada através de suas imunoglobulinas de membrana, que são seus receptores de antígenos.

Figura 8 Mecanismo de cooperação entre linfócitos T e B nas vacinas conjugadas de proteínas e polissacarídeos. Pode ser vista a diferença da resposta imunológica quando se utiliza apenas o polissacarídeo como antígeno (a) e quando ocorre a conjugação entre o polissacarídeo e uma proteína carreadora (POLLARD, PERRETT e BEVERLEY, 2009).



A molécula conjugada é enoitada e processada nas vesículas celulares, onde os fragmentos peptídicos da proteína carreadora, bem como os fragmentos polissacarídeos, são associados às moléculas de MHC classe II, formando um complexo que é exposto na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). Na sequência, as APC apresentam, através do complexo de MHC da classe II, os fragmentos peptídicos e polissacarídicos às células T auxiliares. Ao reconhecer os fragmentos, a célula T induz a ativação e a diferenciação das células B imaturas, tornando-as células imunocompetentes capazes de produzir anticorpos protetores contra polissacarídeos e a proteína carreadora (POLLARD, PERRET e BEVERLY, 2009).

As vacinas precisam garantir segurança e eficácia. Para ser eficaz, uma vacina deve: induzir o tipo correto de imunidade, ser estável ao armazenamento e ter

imunogenicidade suficiente. Porém, somente isto não torna uma vacina ideal. Para ser ideal, ela também deve: não causar infecção; induzir imunidade de longa duração; ter baixo custo; ser de fácil administração; não ter efeitos secundários, como a Síndrome Inflamatória Induzida – ASIA (PELLEGRINO *et al.*, 2015; STEPHANO, 2005); e produzir células de memória.

Melhorando a eficácia das vacinas com adjuvantes ou imunostimulantes

Diversos tipos de adjuvantes ou imunostimulantes em vacinas são utilizados para aumentar imunogenicidade, transporte e liberação (STEPHANO, 2005). Como a vitamina B interage com o sistema imunológico, por meio de sua ação sobre a regulação e a diferenciação de células como linfócitos, macrófagos e células *natural killers* (NK) (KJER-NIELSEN *et al.*, 2012; CHUA e HANSEN, 2012), a sua conjugação com um antígeno poderia ser um novo mecanismo de ação pelo qual o sistema imunológico detectaria infecções microbianas, estimulando as células imunes especializadas.

A vitamina B foi utilizada para ativar uma classe de células imunes tipo T chamadas de MAIT (*mucosa associated invariant*), pois seriam capazes de ligar-se a uma proteína com antígeno, estimulando o sistema imunológico para a diferenciação de células. Em princípio, as vitaminas poderiam agir como “adjuvantes” (substâncias que ativam as células T e B no sistema imunológico), pois as células MAIT detectariam infecções através do metabolismo das vitaminas ligadas às superfícies das células. Alia-se a isso o fato de serem hidrossolúveis, possibilitando sua absorção (KJER-NIELSEN *et al.*, 2012).

A estratégia de encapsulamento em nanopartículas buscou também evitar o uso de adjuvantes, pois existem vários estudos mostrando que, mesmo quando os polissacarídeos são conjugados com uma proteína carreadora, não induzem resposta imune eficaz sem o auxílio de um adjuvante. O uso destes podem causar diversas reações adversas e . Logo, a eliminação do uso de adjuvante seria um diferencial no desenvolvimento de vacinas.

2.13 Vacinas contra o *Streptococcus agalactiae*

A imunização de mulheres grávidas com uma vacina GBS representa uma estratégia alternativa para proteger recém-nascidos e crianças pequenas, através da transferência de anticorpos transplacentários e, potencialmente, reduzindo a nova colonização vaginal (KOBAYASHI *et al.*, 2016; BAKER *et al.*, 1988).

A Glaxo Smith Kline adquiriu, da empresa Novartis, o projeto de desenvolvimento da vacina trivalente contra o *Streptococcus* do grupo B, composta dos sorotipos capsulares Ia, Ib e III conjugada com a variante toxóide de difteria. A vacina já está em fase II com o objetivo profilático. O estudo compara a potência de resposta imunológica induzida pela vacina em dois grupos: mulheres gestantes HIV positivas e HIV negativas. O estudo também investiga o quanto a vacinação maternal induzida é transferida para o recém-nascido. Os anticorpos específicos do sorotipo GBS estão sendo medidos, em mães, nos dias pré-imunização e no trigésimo primeiro dia pós-imunização e, em mães e bebês, durante o parto e no nonagésimo primeiro dia pós-parto. Como resultado já obtido, uma dose da vacina trivalente contra os sorotipos Ia, Ib e III foi bem tolerada, sem sinais de problemas de segurança, possuindo indução da concentração de anticorpos específicos. Entre os pares materno infantis, houve a transferência placentária com anticorpos detectáveis, em 81% (n = 38), 70% (n = 35) e 65% (n = 33), contra os sorotipos Ia, Ib e III, respectivamente. Os filhos de mães vacinadas aumentaram os níveis de anticorpos no nascimento, que persistiram acima dos níveis do grupo placebo até o nonagésimo primeiro dia de idade. Como conclusão do estudo, uma dose de vacina trivalente GBS foi bem tolerada, apresentou sinal de segurança relativa em mulheres grávidas e induziu o aumento das concentrações de anticorpos em mães e sua prole (HALPERIN *et al.*, 2014; HEYDERMAN *et al.*, 2016). Os resultados foram apresentados no [site clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)¹ – um banco de dados de estudos clínicos financiados, de formas privada e pública, realizados em todo o mundo –, sob referências NCT01193920, NCT01446289, NCT02046148 (HEATH, 2016).

Um grande desafio para a saúde pública é desenvolver vacinas eficazes contra doenças infecciosas que tenham relevância global. Muitas das vacinas são desenvolvidas com sorotipos que prevalecem mais em cada país, mas não são otimamente eficazes contra sorotipos comuns a outras partes do mundo. Logo, novas tecnologias e abordagens inovadoras precisam ser usadas para identificar antígenos de GBS que superam a especificidade de sorotipos e que poderiam constituir a base de uma vacina globalmente efetiva contra esse patógeno oportunista (JOHRI *et al.*, 2006).

¹ Disponível em <<https://clinicaltrials.gov>>

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Desenvolver um modelo vacinal para mucosa sublingual, utilizando o polissacarídeo capsular do *Streptococcus agalactiae* como antígeno, encapsulado em nanopartículas de quitosana.

3.2 Objetivos específicos

- Estudar os parâmetros de otimização de fermentação para aumentar a produtividade de cápsula polissacarídica presente na superfície celular
- Extrair e purificar a cápsula polissacarídica
- Caracterização físico-química: DRX, CGMS, NMR e dosagem de açúcar por fenol-sulfúrico
- Liofilizar o polissacarídeo para fins de concentração e conservação
- Encapsular o polissacarídeo em uma Nanopartícula de quitosana (PS acoplado a OVA ou somente PS).
- Analisar a nanoestrutura: DLS e Potencial Zeta
- Determinar o título de IgG sérica específica total e concentração de sIgA total da saliva dos camundongos imunizados via mucosa sublingual.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Plano de trabalho

Diversas fontes bibliográficas foram consolidadas nesse modelo de desenvolvimento vacinal (ZANARDO, 2015; BAKER *et al.*, 2017; TONIOLO *et al.*, 2015; TANIZAKI *et al.*, 1996; PATO *et al.*, 2006). Baseando-se nos princípios básicos de qualidade, segurança e eficácia, levando-se em consideração todas as etapas de bioprocessamento, entre elas: cultivo, extração, purificação, formulação (encapsulamento em Nanopartícula e liofilização) e imunização, foram estabelecidas as caracterizações, detalhadas na tabela abaixo.

Tabela 7 Etapas do modelo vacinal e as caracterizações necessárias para cada uma delas: cultivo e fermentação, purificação e extração, encapsulamento em Nanopartícula, liofilização, inoculação e imunização.

Etapas	Caracterização necessária
Caracterização/Cultivo /fermentação	<ul style="list-style-type: none">❖ Caracterização da cepa: origem, identidade e pureza❖ Teste de Gram – teste de contaminação e pureza❖ Maldi-Tof MS – confirmação de identidade❖ Análise do gene rRNA 16S – confirmação da identidade e pureza❖ Espectrofotometria: curva de crescimento com a utilização de diferentes meios de cultura
Purificação para extração PS	<ul style="list-style-type: none">• Análise colorimétrica por espectrofotometria: para detecção dos açúcares no PS através da hidrólise do PS - Reação de fenol sulfúrico• Análise quantitativa: pesagem da massa seca• Eletroforese SDS-Page: detecção de proteína e análise de pureza• Ensaio de proteínas micro BCA (<i>Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit</i>): detecção de proteínas residuais da purificação• Doseamento de ácido nucléico por espectrofotometria: medida por absorbância A260nm = 50µg/ml• Caracterização: difração de raios-X (DRX) para confirmação da cristalinidade• Análise da estrutura por cromatografia gasosa: (CGMS) e ressonância magnética (NMR)

Liofilização	<ul style="list-style-type: none"> • DSC Calorimetria exploratória diferencial – determinação da temperatura de transição vítrea e temperatura de fusão • Análise com MFD (<i>Microscopie Freeze Drying</i>) Lyostat determinação da temperatura de colapso e temperatura eutética • Liofilização: liofilizador FTS System-Computrac
Encapsulamento	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Formação da Nanopartícula: método de geleificação iônica com o biopolímero Quitosana e Tripolifosfato ❖ BCA – avaliação da taxa de encapsulamento ❖ Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) – avaliação do tamanho das Nanopartículas. Análise do Potencial Zeta e Índice de Polidispersão (PDI)
Imunização de mucosas sublingual	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Provas bioquímicas imunológicas: Elisa (dosagem de IgG e sIgA total)
Análises Estatísticas dos testes imunológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de Variância (ANOVA) com ferramenta de Bonferrone

4.2 Caracterização, cultivo e fermentação

Origem: Cepa de *Streptococcus agalactiae*

A cepa de *Streptococcus agalactiae* foi adquirida do Núcleo de Coleção de Microorganismo do Instituto Adolfo Lutz IAL – São Paulo. A referência da cepa: *Streptococcus agalactiae* (CT) – INCQS 00128, ATCC 12386 (ATCC – *The American Type Culture Collection*), correspondente às cepas bacterianas sorotipo Ia – *Streptococcus agalactiae* 090A, sob a referência: Cepa: O90A (E. Todd Aronson Wamoscher).

Pureza e contaminação

O método de coloração de Gram foi realizado para se avaliar a pureza da cultura e como identificação bioquímica do grupo gram-positivo.

Através da avaliação microscópica, foi confirmada a sua morfologia. Para o plaqueamento, foram utilizadas 3 placas de Petri com meio BHI (Sigma), armazenadas em estufa bacteriana, à temperatura de 37°C, por 18 horas.

Confirmação de identidade

A confirmação da identidade foi realizada por metodologia de espectrofotometria de massa MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*); ou seja, dessorção/ionização por *laser* assistido por matriz. O teste foi realizado no Laboratório de Microbiologia Clínica no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF/USP, com o Professor Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio.

O equipamento Bruker Matrix HCCA (referido como 'Bruker HCCA'; HCCA = ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico) identifica microrganismos através de um tubo contendo $2,5 \pm 0,3$ mg de matriz, comparando as proteínas ionizadas com o banco de dados existente. Caso o *score* seja maior ou igual a 2, pode-se afirmar que a identidade é perfeita. A matriz, por ser de natureza ácida, ajuda a romper as células e a extrair as proteínas, separando as moléculas proteicas, que são aderidas na placa sólida. Ocorre, assim, a absorção da energia do *laser*, provovendo a dessorção das moléculas (extração da placa sólida onde estão aderidas para o estado gasoso) e a doação de H^+ para as moléculas que possam a ser íons de carga positiva (ALMEIDA JÚNIOR, 2014). Os íons formados com carga +1 são acelerados sob a influência do campo elétrico de carga positiva para dentro de um tubo de voo, no qual o detector encontra-se na extremidade. O tempo de voo de cada partícula é utilizado para calcular sua massa.

Foi também realizado o teste 16S *rRNA* genômico “Kit” “Wizard® Genomic DNA purification” (Promega), seguindo o protocolo para extração de DNA total de bactérias gram-positivas, conforme indicado pelo fabricante. A amplificação do rDNA 16S foi realizada como descrito por Hornink (2015). Os produtos de PCR, resultantes da amplificação do 16S *rDNA*, foram sequenciados no sequenciador automático “ABI 3730 DNA Analyser” da “Applied Biosystems”, no Departamento de Genoma Humano do Instituto de Biociências da USP, com a colaboração da pós-doutoranda Tais Ayumi Kuniyoshi.

Organização do Banco Mestre e do Banco de trabalho

Expansão: a expansão da cepa semente liofilizada, adquirida do Núcleo de Coleção de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz, foi realizada em 0,5 ml de meio *Brain Heart Infusion* (BHI) marca Merck S.A., contendo: substratos nutritivos (extrato de cérebro, coração e peptona - $27,5 \text{ g.L}^{-1}$), D-glucose ($2,0 \text{ g.L}^{-1}$), cloreto de sódio ($5,0 \text{ g.L}^{-1}$) e fosfato dissódico de hidrogênio ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$). A cepa ressuspensa foi bem homogeneizada

e toda a suspensão foi transferida para o Erlenmeyer estéril contendo 250 ml de Meio BHI da empresa Merck S.A., para preparação do pré-inóculo. O frasco foi incubado sob as seguintes condições: temperatura 37°C, tempo de incubação 12 horas, velocidade a 250 rpm no *shaker* New Brunswick Scientific Excella[®] Incubator Shaker. O protocolo de cultivo do *Streptococcus agalactiae* foi estabelecido a partir das recomendações do “Certificado de Análise e Dados Técnicos” do Banco de Micro-organismos do Instituto Adolfo Lutz.

Banco Mestre: o volume da cultura do banco semente expandido a ser transferido para o banco mestre foi calculado de acordo com a equação:

$$V_{in} = V_{cult} \times 0,1/DO_{in}$$

Onde:

V_{in} = volume da cultura do inóculo a ser transferido para o meio de cultura

V_{cult} = volume de meio de cultivo

DO_{in} = densidade ótica a 600 nm da cultura do inóculo

Baseado nesta equação, foram transferidos 2 ml para um frasco Erlenmeyer contendo 100 ml de meio BHI, pH 7.2-7.4 e incubado na temperatura de 37°C, tempo de incubação 12 horas, velocidade a 250 rpm no *shaker* New Brunswick Scientific Excella[®] Incubator Shaker.

Após 12 horas e cultivo do banco mestre, foram adicionados 50g de glicerol (20% do w/v), para garantir que, após o congelamento, não se formasse cristal e a membrana bacteriana não se rompesse quando o microrganismo fosse ressuspenso. As amostras foram aliqüotadas em eppendorf, no volume de 1 ml, sendo armazenadas no freezer a -60° C. Foram congelados 200 eppendorfs contendo banco mestre de GBS, de modo a termos material suficiente até o término do projeto e, caso necessário, novas culturas fossem realizadas, permitindo a condução de outros estudos com a mesma cepa.

Banco de Trabalho

Para o Banco de Trabalho, foram utilizados 2 ml do banco mestre para cada Erlenmeyer com 100 ml. Foram cultivados dois meios: BHI e TSB (Figura 9) nas condições já descritas.

Figura 9 Banco de trabalho: condições de cultivo: descontínuo em batelada em Shaker, Erlenmeyer com 100 ml de meio com inóculo GBS, temperatura 37°C, tempo de incubação 12 horas-14 horas, velocidade a 250 rpm no New Brunswick Scientific Excella® Incubator Shaker



A partir da análise das rotas metabólicas do banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), foram adicionados três aditivos nutricionais, que poderiam melhorar as diferentes rotas metabólicas e a produção de cápsula polissacarídica. Foram escolhidos os suplementos: Inosina, L-prolina e Ácido nicotínico (Tabela 8).

Tabela 8 Suplementos escolhidos para serem adicionados ao meio de cultivo, objetivando estimular as rotas metabólicas e aumentar a produção de cápsula polissacarídica.

Suplemento	Descrição
Ácido nicotínico	Convergente da via glicolítica através do gliceraldeído-3 fosfato. Também denominado como Vitamina B3, solúvel em água. Descrito no Banco de Dados KEGG como parte do metabolismo de cofatores e das vitaminas através da biossíntese de alcaloides derivados de ornitina, lisina e ácido nicotínico. (http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00760)
L-prolina	Aminoácido, descrito no Banco de Dados KEGG como parte do metabolismo dos aminoácidos – através das rotas metabólicas de arginina e prolina. Convergente para a via metabólica óxido reductiva (ciclo de Krebs) através do intermediário 2-oxoglutarato. (http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map00330)

Inosina

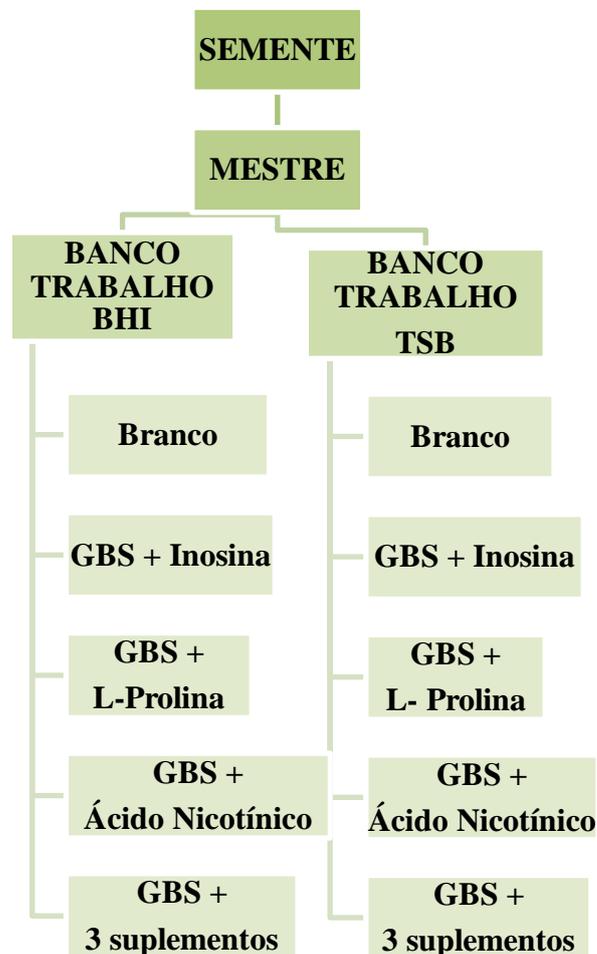
Descrito no Banco de Dados KEGG como parte de metabolismo de nucleotídeos. Estimula a via das pentoses e a via glicolítica. Estimula as vias produtoras de açúcares.

([https://www.genome.jp/kegg-](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00520&show_description=show)

[bin/show_pathway?map=map00520&show_description=show](https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map=map00520&show_description=show))

Em 2 frascos, cada um contendo 100 ml de meio de cultura base BHI, e o outro TSB, foram adicionados 2 ml do banco mestre de GBS. Após 12 horas, o cultivo foi transferido, repicado em mais 4 frascos com 100 ml para cada meio de cultura (total 8 frascos), sendo que foram mantidos 2 frascos de meio BHI e meio TSB sem inóculo – denominados como brancos (Figura 10).

Figura 10 Modelo do planejamento do Banco Semente, Banco Mestre e Banco de Trabalho com meios BHI e TSB: sem inóculo (branco), suplementado com Inosina, L-Prolina, Ácido Nicotínico e os três suplementos em conjunto.



As condições de cultivo foram às mesmas anteriores. Foram adicionados 150 mg de cada suplemento, de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9 Tabela descritiva dos experimentos de cultivos celulares com respectivos meios de cultura e suplementos nutricionais, correspondente à primeira fase de pré-inóculo (FI) e posterior cultivo do inóculo (FII). Os frascos foram identificados de A até N, com meios de cultura TSB (meio de soja) e BHI (infusão de cérebro e coração) com os suplementos: inosina, L-prolina e ácido nicotínico, em condições de cultivo descontínuo em batelada: temperatura 37°C, tempo de incubação 12 horas, pH 7,2-7,4, velocidade a 250 rpm no New Brunswick Scientific Excella® Incubator Shaker

Etapa	Frasco	Conteúdo
FI	A	Branco 100 ml de meio TSB
FI	B	Branco 100 ml de meio BHI
FI	C	2 ml GBS + 100 ml de meio BHI
FI	D	2 ml GBS + 100 ml de meio TSB
FII	E	2 ml GBS + 100 ml de meio BHI
FII	F	2 ml GBS + 100 ml de meio TSB
FII	G	2 ml GBS + 100 ml de meio BHI + 150 mg inosina + 150 mg ácido nicotínico + 150 mg L-prolina
FII	H	2 ml GBS + 100 ml de meio TSB + 150 mg inosina + 150 mg ácido nicotínico + 150 mg L-prolina
FII	I	2 ml GBS + 100 ml de meio BHI + 150 mg inosina
FII	J	2 ml GBS + 100 ml de meio TSB + 150 mg inosina
FII	K	2 ml GBS + 100 ml de meio BHI + 150 mg ácido nicotínico
FII	L	2 ml GBS + 100 ml de meio TSB + 150 mg ácido nicotínico
FII	M	2 ml GBS + 100 ml de meio BHI + 150 mg L-prolina
FII	N	2 ml GBS + 100 ml de meio TSB + 150 mg L-prolina

A densidade ótica (DO) da cultura celular foi determinada por espectrofotômetro de luz visível a 600 nm, no equipamento Spectra Mx Plus 384. Meio de cultivo puro sem inóculo (branco) foi utilizado como zero da densidade ótica. Quando a absorbância ultrapassava os valores de 0,5, as amostras eram diluídas e o resultado multiplicado pelo valor da diluição para determinação do curva de crescimento celular.

4.3 Escolha do meio de cultivo (BHI ou TSB)

O microrganismo GBS possui as seguintes características:

- Tipo metabólico: organotrófico (fermentação)
- Bactéria anaeróbica – aerotolerante, anaeróbio facultativa
- Tipo de organismo: quimiorganotrófico (fonte de energia – compostos orgânicos)
- Fonte de carbono: compostos orgânicos
- Fonte de energia: reações de oxirredução
- Fermentação tipo homolática

Para o crescimento celular do GBS, comparamos os meios de cultivo *Brain Heart Infusion* (BHI) o meio *Trypticase soy agar broth* (TSB), recomendados pelo ATCC. Adicionamos os suplementos nutricionais (Inosina, L-Prolina e Ácido Nicotínico), a partir dos estudos das vias metabólicas, disponíveis no Banco de Dados KEGG. A proposta de suplementação era projetar e planejar um meio de cultura para atender às necessidades específicas do microrganismo e aumentar o potencial de redução da cadeia metabólica, de modo, a mudar a energia gerada na cadeia de transporte de elétrons. Os três suplementos nutricionais poderiam substituir, no meio de cultivo TSB, os produtos de origem animal e, conseqüentemente, melhorar o crescimento celular e a produção de cápsula polissacarídica.

As diferentes seqüências de reações convergentes e divergentes descritas no banco de dados geram requisitos de energia diferentes para os processos de catabolismo e anabolismo do microrganismo, ocorrendo, também, diferentes velocidades do metabolismo e dos blocos de construção das estruturas bacterianas.

4.4 Purificação para extração do polissacarídeo (PS)

O protocolo de purificação foi adaptado, a partir dos métodos descritos por Tanizaki *et al.* (1996), Takagi *et al.* (2008), Albani (2008) e Zanardo (2015), envolvendo várias etapas de precipitação e de centrifugação para a separação de células, debris celulares do caldo e isolamento da cápsula polissacarídica.

Após o crescimento celular, foi adicionado 0,1% de Cetavlon (*cetyltrimethylammonium bromide*). Após agitação para solubilização do Cetavlon, o cultivo celular foi mantido em repouso para que houvesse a inativação por lise celular. As

amostras com Cetavlon foram centrifugadas no equipamento marca HERMLE Z32HK, por 5 minutos, com rotação de 8.000 rpm (6580 rcf – força centrífuga relativa).

O volume relativo, correspondente ao precipitado, corresponde a aproximadamente a 1/10 do volume de cultivo. Por sua vez, o precipitado foi lavado 3 vezes com cloreto de sódio 0,9%, com volume relativo a 6 vezes o volume do precipitado. Em todas as lavagens, o sobrenadante foi descartado e, por fim, os *pellets* foram ressuspensos, até 10 ml, com cloreto de cálcio 0,9%. A segunda etapa da purificação foi realizada através de concentração em membrana com capacidade de retenção de biomoléculas acima de 30 kDa (membrana polietersulfona Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter, Merck).

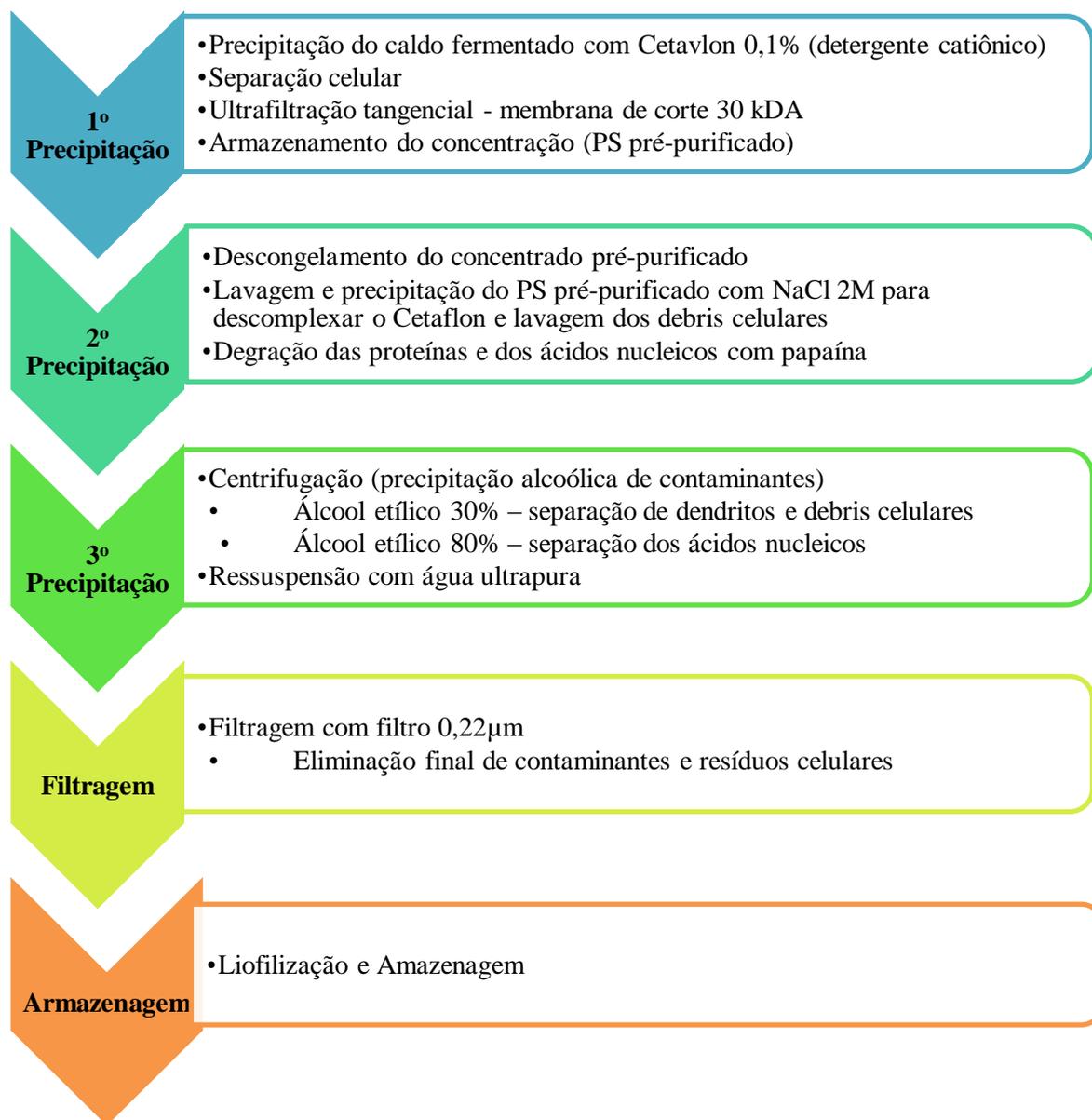
O concentrado foi armazenado a -60°C em tubos Falcon para realização das próximas etapas de purificação (figura 11).

A próxima etapa de purificação seguiu os procedimentos:

1. Descongelamento do PS pré-concentrado – volume 150 ml
2. Acréscimo de 20% NaCl 2M (w/v) – 30 ml
 - a. Mantido sob agitação por 1 hora
3. Centrifugação da amostra a 3.500 rpm (1260 rcf) – 30 minutos – temperatura ambiente
 - a. Coleta do sobrenadante, descarte do precipitado
4. Ao sobrenadante, acréscimo de 9% papaína (w/v)
 - a. Homogeneização e mantido em banho-maria (60°C) por 18 horas.
5. Centrifugação a 3.500 rpm (1260 rcf) – 60 minutos – temperatura ambiente
 - a. Coleta do sobrenadante, descarte do precipitado
6. Ao sobrenadante, foi acrescentado o volume relativo de 30% (v/v) álcool etílico absoluto PA (Synth)
7. Centrifugação a 8.000 rpm (6580 rcf) – 60 minutos – temperatura ambiente
 - a. Descarte do precipitado, coleta do sobrenadante
8. No sobrenadante, foi acrescido 80% (v/v) álcool etílico absoluto PA (Synth)
9. Centrifugação a 8.000 rpm (6580 rcf) – 60 minutos – temperatura ambiente
 - a. Descarte do sobrenadante, coleta do precipitado

10. O precipitado foi ressuspenso em 15 ml água ultrapura
10. Filtragem com Filtro 0,22 μ m
11. Liofilização e armazenamento

Figura 11 Esquema de purificação do polissacarídeo, com as etapas de inativação, eliminação de dendritos celulares, ácidos nucleicos, tratamento enzimático, ultrafiltração e secagem.



Quantificação relativa dos açúcares no polissacarídeo

Para a quantificação dos açúcares presentes no polissacarídeo, foi utilizado o método fenol-sulfúrico (CUESTA *et al.*, 2003; DUBOIS *et al.*, 1956; Dische e Shettles, 1948).

A curva padrão foi determinada pela análise das concentrações variadas de glicose, galactose, sucrose e mistura dos 3 açúcares com concentrações variando de 0,1 a 1 mg/ml. A concentração das amostras foi calculada através da curva padrão, considerando-se o fator de diluição.

Pesagem da massa seca: concentração de polissacarídeo

Os valores das variáveis foram obtidos de acordo com as equações abaixo:

$$PS\ total\ (mg) = Cps * \frac{V}{1000}$$

Sendo Cps a concentração de polissacarídeo ($\mu\text{g/ml}$) e V o volume da fração (mL).

Deteção de proteínas - Eletroforese SDS-PAGE

Com o objetivo de se identificar a existência de proteínas residuais, utilizou-se a técnica de SDS-PAGE (*SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). A eletroforese foi realizada com gel de poliacrilamida 10% e tempo de separação 1h30min.

Após a eletroforese, o gel foi corado com uma mistura de 0,1% de Coomassie Blue R. Após isso, foi descorado com uma mistura composta por 10% de metanol e 7% de ácido acético.

Dosagem de proteínas (kit de ensaio de proteínas micro BCA)

O kit de ensaio de proteína BCA – Acido Bi-cinconínico (SIGMA) foi utilizado para deteção e quantificação colorimétrica de proteínas residuais. Foi utilizado para quantificação de proteínas na solução final do purificado. O princípio do ensaio do ácido bicinconínico (BCA) baseia-se na formação de um complexo de proteínas Cu^{2+} em condições alcalinas, seguido de redução do Cu^{2+} para Cu^{1+} . A quantidade de redução é proporcional à proteína presente.

O ensaio BCA é mais sensível e aplicável do que os procedimentos de Lowry. Além disso, tem menos variabilidade do que o ensaio de Bradford. A faixa de deteção é de 20 μg a 100 μg proteína total.

Doseamento de ácido nucleico

A partir dos processos de purificação, a concentração de ácidos nucleicos (A_n) residual foi medida pela absorvância a 260nm (A_{260nm}), considerando 1 unidade igual a 50µg/ml de ácidos nucleicos.

$$An\ total\ (mg) = C_{an} * \frac{V}{1000}$$

Sendo C_{an} a concentração de ácido nucléico (µg/ml) e V o volume da fração (mL).

Identificação de cristalinidade - Difração de Raios-X

A difração de raios-X foi realizada para caracterização e identificação da cristalinidade do PS.

A análise foi realizada no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, no Departamento de Cristalografia, de responsabilidade da Prof^a. Dra. Marcia Fantini, sob a supervisão do especialista Dr. Antônio Carlos Franco da Silveira.

Foi utilizado o equipamento X Ray Diffractometer, marca Rigaku, modelo Ultimat, tubo de cobre (radiação $K\alpha = 154A$), potência de trabalho 40 KV, 30 mA, *software* de análise, Jade 6.5.

Identificação da composição monossacarídica – cromatografia gasosa CGMS

O polissacarídeo (5 mg) foi submetido a dois ciclos de metilação. O polissacarídeo metilado foi hidrolisado com 5 mol/L de ácido trifluoroacético por 4h, à temperatura de 100°C, reduzido com boro-hidreto; os alditóis foram acetilados com anidrido acético: piridina (1:1 v/v). Os acetatos de alditol dos açúcares metilados foram dissolvidos em clorofórmio e analisados numa unidade de cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GCMS-QP2010 Shimadzu, Japão) com uma coluna Restek RTX-5MS (KIRCHER,1960). O gás de transporte foi o hélio, em gradiente de temperatura de 110°C a 250°C, com variação de 2°C/min. As temperaturas de injetor, fonte de íons e interface foram de 260°C, 200°C e 230°C, respectivamente. Diferentes períodos de tempo para a hidrólise do polissacarídeo metilado foram testados (de 1 a 4 h), para assegurar a hidrólise total das unidades constitutivas, mas sem perda significativa de resíduos de xilose. As análises foram realizadas pelo pesquisador Dr. Paulo Soares e pelo Prof. Dr. Paulo Mourão, no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Laboratório

de Tecido Conjuntivo, do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Identificação da estrutura – Ressonância Magnética (NMR)

As análises de NMR foram realizadas em parceria com a Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo pesquisador Dr. Paulo Soares e pelo Prof. Dr. Paulo Mourão, no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Laboratório de Tecido Conjuntivo do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os experimentos foram repetidos no Laboratório de Física, na Universidade de São Paulo, com o pesquisador Dr. Antônio Carlos Bloise Júnior.

Os espectros 1D e 2D ^1H do polissacárido da cápsula GBS foram analisados utilizando-se um espectrómetro de RMN de 500 MHz (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemanha) com uma sonda de ressonância tripla (SANTOS *et al.*, 2017). Aproximadamente 10 mg da amostra foram dissolvidos em 0,5 mL de óxido de deutério 99,9% (Cambridge Isotope Laboratory, Cambridge, MA). Todos os espectros foram registrados em 310K com supressão do sinal da água de contaminação proveniente da troca do átomo de deutério pelo átomo de hidrogênio da umidade do ambiente durante a manipulação das amostras. Para os espectros de 1D e ^1H RMN, 32 médias foram registradas por amostra, usando um tempo de repetição igual a 1s. Para os experimentos 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ -TOCSY (espectroscopia correlacionada total) e $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*), os espectros foram registrados usando uma ciclagem de fases dos pulsos do tipo TPPI (incremento de fase da proporção temporal) para detecção de quadratura na dimensão indireta. Os espectros de fase-TOCSY foram executados com 2048×1024 pontos com um campo de spinlock de 10 kHz e um tempo de mistura de 80 ms.

Os espectros bidimensionais de $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ Multiplicity-Edited HSQC foram registrados com 256 médias por amostra. A configuração do número de incremento foi ajustada para 64 e novamente utilizada a ciclagem de fase dos pulsos por TPPI para detecção de quadratura na dimensão indireta. Foram utilizados 1024×512 pontos, com pulsos retangulares de fase alternada, globalmente otimizados (GARP) para desacoplamento. Os desvios químicos foram apresentados em relação ao sinal de CH₃ dos resíduos de a-L-ramnose usualmente encontrados nos polissacáridos da cápsula de GBS (Ravenscroft *et al.*, 2017; Kogan *et al.*, 1996).

Liofilização do polissacarídeo

A vantagem da liofilização do PS é o aumento do tempo de estabilidade. A liofilização caracteriza-se pela secagem rápida de uma substância previamente congelada, por meio da sublimação, e tem como objetivo principal a remoção de qualquer solvente no estado sólido, transformando-o em gasoso, sem passar pelo estado líquido. A liofilização divide-se em três etapas: na primeira, o material é congelado, o que envolve a aquisição de uma matriz sólida; a seguir, no segundo estágio, a água é sublimada sob pressão reduzida. Quando toda a água livre congelada for removida por sublimação, encerra-se a secagem primária. Na terceira etapa, ocorre a secagem secundária, ou dessorção, na qual a água presa na estrutura molecular do núcleo é removida por aumento da temperatura até que o produto alcance a umidade residual desejada, ou seja, uma secagem a vácuo (por pressão reduzida).

Para identificar os parâmetros da liofilização, foram realizadas as análises de DSC e Lyostat.

A análise térmica em DSC (*Differential Scanning Calorimetry* – Calorímetro Exploratório Diferencial) foi realizada no equipamento marca Perkin Elmer precisely, DSC 4000. O objetivo foi a determinação da temperatura de transição vítrea para posterior otimização no processo de liofilização. Foram utilizados recipientes (cadinhos) de alumínio contendo aproximadamente 10 mg de amostra. Inicialmente, a amostra foi estabilizada à temperatura ambiente de 25° C e, posteriormente, foi resfriada até -55° C, em taxa de resfriamento de 10° C/min, com isoterms de 3 minutos. A calibração do equipamento foi realizada com água destilada (ponto de fusão 0° C). O cadinho vazio foi utilizado como referência. A análise térmica por DSC determinou a temperatura de transição vítrea (T_g) e temperatura eutética (T_{eut}).

A temperatura de colapso (T_c) do polissacarídeo foi determinada por um MFD (*Microscopie Freeze Drying*) Lyostat - microscópio acoplado a um módulo de liofilização (Lyostat 2, modelo FDCS 196, Linkam Instruments, Surrey, UK), equipado com sistema de congelamento por nitrogênio líquido (LNP94/2) e controlador de temperatura programável (TMS94, Linkam). A pressão utilizada durante as análises foi de 100 mTorr, através de uma bomba de vácuo (Edwards E2M1.5, Linkam). Amostras com 1 μ L foram pipetadas sobre uma placa de quartzo de 16 mm, coberta com placa de vidro. Posteriormente, foram congeladas até -60° C e a pressão do sistema reduzida. A observação direta do congelamento e da liofilização foi realizada com microscópio de luz polarizada Nikon, modelo Elipse E600 (Nikon, Japão).

O polissacarídeo foi liofilizado a partir dos parâmetros provenientes do DSC e do Liostat 2. A liofilização foi realizada em um aparelho liofilizador FTS Systems modelo TDS-00209-A, microprocessado com secador controlado de bandejas (Dura-Stop, Dura-Dry-MP). As amostras foram acondicionadas em frascos com 2 ml de PS purificado ressuspensionado em água ultrapura (concentração de 1mg/ml).

4.5 Encapsulamento em Nanopartícula

Preparação da Nanopartícula

Nanopartículas de quitosana foram preparadas com os seguintes reagentes: quitosana de baixo peso molecular (Sigma-Aldrich 448869, CAS 9012-76-4) IV, tripolifosfato de sódio 85% (Sigma-Aldrich, CAS 7758-29-4), ácido acético glacial P.A. (Synth), cloreto de sódio P.A. (Synth), PS de *Streptococcus agalactiae* e proteína OVA acoplada, glicerol (Sigma-Aldrich, G6279, CAS: 56-81-5), água ultrapura (Milli-Q) e vitamina B9 líquida.

Para a formação das nanopartículas, duas soluções distintas foram utilizadas: a primeira, contendo quitosana diluída em uma solução de ácido acético (1%) em água (volume/volume), a 2mg/ml (pH final 5;0); a segunda, composta por uma solução de tripolifosfato de sódio (TPP) à concentração de 1mg/ml, na qual foi adicionado o antígeno PS de *Streptococcus agalactiae*, conjugado com a proteína, à concentração de 0,160mg/ml e solução de vitamina B à concentração de 0,150mg/ml.

Os passos para a preparação da Nanopartícula foram: 1) preparação da solução de quitosana; 2) preparação da solução de TPP; 3) formação da Nanopartícula.

Solução de quitosana – passos para preparação de 30 ml de quitosana a 2mg/ml: em um béquer, foram medidos e adicionados 300uL (0,3ml) de ácido acético glacial. Foram acrescidos 15ml de solução salina a 0,9%. Pesados 0,06g de quitosana em pó e transferidos para um béquer. Acrescido à preparação de solução salina a 0,9% e ácido acético glacial, preparada anteriormente. A solução resultante foi homogeneizada em um agitador magnético (500 rpm, temperatura ambiente, por 2-4 horas até solubilização total). Foi ajustado o pH 5 com NaOH 1M e completou-se com solução salina a 0,9% até o volume final de 30 ml. Após a homogeneização da solução, a solução foi filtrada no filtro Millipore 0,22 um com uma seringa com agulha 3. Deixou-se a solução de quitosana por 48 horas em estado de repouso na geladeira 4°C.

Solução de TPP – passos para preparação de 30 ml de tripolifosfato de sódio a 1 mg/ml (TPP): foram pesados 30 mg de TPP e adicionados 30 ml de água ultrapura. Solubilizado bem, tudo foi homogeneizado com um agitador magnético 500 rpm, por 30 minutos a 25 °C.

Formação da suspensão de Nanopartícula (proporção 3:1 - quitosana:TPP massa/massa) – processo de geleificação iônica: um béquer de 50 ml de capacidade foi agitado a 750 rpm, em agitador magnético, com 6 ml da solução de quitosana (2mg/ml). Foram adicionados a esta solução 100µL de Tween 20. Com uma seringa com capacidade de 10 ml, foi adicionada a solução de quitosana, uma solução de TPP, ora com PS de GBS, ora com PS acoplado com proteína, ora acrescido de PS com proteína e vitamina B9. Esta adição de TPP foi realizada de maneira contínua, à temperatura de 25°C, sob agitação contínua, a 750 rpm. Após a adição, foi mantida, sob agitação, por 1 hora, à temperatura de 25 °C.

Em microtubos de 2 ml, foram colocados, no fundo do tubo, 10 ul de glicerol. Adicionou-se 1 ml de suspensão de nanopartículas em cada tubo, que foi centrifugada a 11.750 rpm por 30 minutos, a 25°C. Retirou-se o sobrenadante com uma micropipeta. Foi ressuspendido o precipitado com água Milli-Q, sendo centrifugado novamente a 11.750 rpm, por 30 minutos, a 25 °C. Foi descartado o sobrenadante com micropipeta e ressuspendido o centrifugado com água filtrada.

O primeiro sobrenadante foi guardado para posterior análise de teor proteico de OVA pelo método de BCA.

Determinação da taxa de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi calculada de maneira indireta, por ensaio de proteína por método de BCA (Acido Bi-cinconínico). Foi calculada a concentração de proteína no primeiro sobrenadante do centrifugado, após a formação da Nanopartícula. A proteína alvo foi a OVA (Sigma-Aldrich). A curva padrão foi realizada com albumina de soro bovino (BSA – Sigma Aldrich) em concentrações que variaram de 0,2 mg/ml a 1 mg/ml. Foi realizada a leitura de absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda 550nm, leitor de microplacas (Biotek – PowerWave XS2).

Foi calculada a concentração de proteínas dos grupos 2 (nano com proteína e polissacarídeo acoplados), 3 (nano com polissacarídeo), 4 (nano vazia) e 7 (nano com PS, proteína e vitamina). Os grupos 3 e 4 são controles negativos, pois não apresentam proteínas nas suas formulações; desse modo, o resultado da concentração de proteína no

sobrenadante no grupo 2 e no grupo 7 foi obtido através da média da subtração do grupo 2, menos a do grupo 3, e do grupo 2, menos a do grupo 4. O mesmo cálculo foi feito para o grupo 7.

Análise de espalhamento dinâmico da luz (DLS) – tamanho da Nanopartícula

As amostras de polissacarídeo purificado foram acopladas com OVA, nanoencapsuladas em nanopartículas e tiveram seu diâmetro hidrodinâmico, bem como sua polidispersão, avaliados por espalhamento da luz no instrumento Zetasizer Nano S (Malvern - DTS Ver. 5.03 MAL1020400 (Malvern Instruments) a 25° C.

O DLS (*Dinamic Light Scattering*) mede a intensidade de luz espalhada por uma partícula, a partir do movimento browniano e da equação de Stocken-Einstein. Este método ilumina as partículas com luz *laser*, analisando-se as flutuações de intensidade de luz dispersa. Também foi determinado o índice de polidispersão, determinando-se a heterogeneidade de distribuição de tamanhos das nanopartículas no sistema, que varia de 0 a 1. Quanto maior o número de populações com diferentes tamanhos, maior é o índice de polidispersão. As medidas foram avaliadas no instrumento Malvern Instruments - Malvern - DTS Ver. 5.03 Zetasizer Nano S MAL1020400 a 25° C.

O potencial Zeta determina a mobilidade eletroforética das partículas e está associado à medição do potencial da superfície das nanopartículas, em função da dissociação de grupos funcionais presentes na superfície das partículas ou em função da adsorção das espécies iônicas presentes na solução coloidal (ANDRADE, 2018; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As amostras foram analisadas no Laboratório de Sistemas Biomiméticos, da Profa. Dra. Iolanda Cuccovia, com a colaboração do pós-doutorando Gustavo Penteado Battesini Carretero, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Para a leitura, utilizou-se uma cubeta de quartzo (capacidade 3,5 ml), na qual foram pipetados 1,0 ml da amostra desejada e 2,5 ml de água filtrada; a leitura foi realizada a 25° C.

4.6 Imunização de mucosas sublinguais

Esquema de imunização

A determinação da antigenicidade foi feita em 48 camundongos BALB/c, fêmeas (provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da USP), com 4 semanas de

idade, pesando em média 16 g, alimentados com ração e água *ad libitum*, mantidos no Biotério de Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêutica, na proporção de 3 camundongos por gaiola.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob número CEUA/FCF 9.2017-P536.

O esquema de imunização foi baseado em três doses sublinguais, com intervalo de 1 semana entre elas e duas doses intraperitoneal (conforme Tabela 10).

As inoculações foram feitas com os animais sedados por isoflurano inalatório. As imunizações foram realizadas com amostras na concentração final de 7,5 µg de PS, 7,5 µg OVA e 4,5 µg de vitamina.

Tabela 10 Esquema de inoculação e coleta de sangue dos camundongos. O esquema de imunização foi baseado em três doses sublinguais, com intervalo de 1 semana entre elas e duas doses intraperitoneal

Dia	0	7	14	21
Inoculação sublingual – G1, G2, G3, G4, G7, G8	x	x	x	
Inoculação intraperitoneal – G5, G6	x		x	
Coleta de sangue		x	x	x
Coleta (muco salivar)				x

A quantificação de anticorpo IgG sérico específico para polissacarídico e a dosagem de IgA total salivar foram determinadas por ensaio imunoenzimático (ELISA).

A quantificação de IgG iniciou-se pela sensibilização de uma placa com 96 poços com 100µL/poço de uma solução de BSA (200µg/ml) em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, incubada por 15 horas, a 4° C. Na sequência, as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-Tween 20 (PBS-T 0,05%). Posteriormente, foram incubados 20µg/ml de PS do GBS com periodato de sódio 0,06M em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, por 18 horas, a 4° C, no escuro. Após a sensibilização completa, houve o bloqueio das placas com uma solução 0,05% PBS-Gelatina, por 1h, à temperatura ambiente. Na sequência, as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-Tween 20 (PBS-T 0,05%). Foram acrescentados 200 µL do soro previamente diluído na concentração 1/10 em PBS acrescido de 0,05% BSA e, subsequentemente, diluídos na proporção 1/2, incubados por 1 hora, a 37° C. Após nova lavagem com PBS-T, adicionaram-se 100 µL/poço de uma solução contendo anticorpo anti-camundongo

conjugado à peroxidase marca KPL (*peroxidase labeled antibody to mouse IgG* (0,1 mg/ml), diluído 1:1000. Incubou-se tudo por 1 hora, a 37° C. Subsequentemente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. Foram adicionados 100 µL de uma solução tampão de citrato contendo 400µg/mL de OPD marca Sigma Aldrich (o-fenildiamina phenyendiamin 99,5%) e 5µL/ml de peróxido de hidrogênio 10% por 30 minutos, por 30 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 µL de ácido sulfúrico 3M após 30 minutos e submetida à leitura de placa no comprimento de onda a 492 nm. O título de anticorpo foi determinado pela dose imunoreativa efetiva 50%.

A quantificação de sIgA iniciou-se pela sensibilização de uma placa com 96 poços. A quantificação de anticorpo sIgA foi realizada através do seguinte procedimento: *coating* com 100 µL/poço das salivas dos camundongos (10µL salina adicionado com 90 µL bicarbonato tampão 0,1 M pH 9,6) e *coating* com o controle positivo: diluições em série a partir de 100µL/poço de uma solução (20 µL IgA_k (IgA_k marca Terc15 – Sigma) adicionado com 80 µL bicarbonato tampão), incubado por 18h, temperatura refrigerada 4°C.

Na sequência, as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-Tween (PBS-T 0,05%). As cavidades livres foram bloqueadas com 100 µL/poço de uma solução de PBS com leite Mólico 0,5%, incubadas por 2 horas, à temperatura ambiente, 25°C. Na sequência, as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-Tween (PBS-T 0,05%).

Foram pipetados 100 µL/poço de uma solução contendo anticorpo IgA_α (marca Sigma) conjugado à peroxidase e diluído 1:2000, sendo incubada por 2 horas, a 25° C. Na etapa final, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente, no escuro, com 100 µL de uma solução tampão de citrato contendo 400µg/mL de OPD marca Aldrich (o-phenyendiamin 99,5%) e 5µL/ml de peróxido de hidrogênio 10%. A reação foi cessada com 50 µL de ácido sulfúrico 3M e a absorbância foi medida a 492 nm. O título de anticorpo foi determinado como sendo a diluição na qual se obtém uma D.O. 0,1.

Grupos de imunização

Os animais foram divididos em grupos (G) de 6 camundongos cada, sendo mantido 3 animais em cada gaiola (Tabela 11). Os camundongos dos grupos G1, G2, G3, G4, G7 e G8 foram imunizados via sublingual, nos dias 0, 7 e 14. Os camundongos dos

grupos G5 e G6 foram imunizados via intraperitoneal, nos dias 0 e 14. Foi coletado sangue, via mandibular, nos dias 7, 14 e 28, após a primeira imunização, para titulação de anticorpos totais.

Tabela 11 Grupos de controle de imunização e número de animais utilizados. Os animais foram divididos em grupos (G) de 6 camundongos cada. Os camundongos dos grupos G1, G2, G3, G4, G7 e G8 foram imunizados via sublingual, nos dias 0, 7 e 14. Os camundongos dos grupos G5 e G6 foram imunizados via intraperitoneal, nos dias 0 e 14. Foi coletado sangue, via mandibular, nos dias 7, 14 e 28, após a primeira imunização, para titulação de anticorpos totais.

Grupo	Controle	N. animais	Dose	Via Administração
G1	Cápsula GBS + proteína	6	10 µl/15 µg de amostra	sublingual
G2	NANO com cápsula PS GBS + proteína	6	10 µl/15 µg de amostra	sublingual
G3	NANO com cápsula PS GBS	6	10 µl/15 µg de amostra	sublingual
G4	NANO vazia	6	10 µl/15 µg de amostra	sublingual
G5	Controle negativo com solução salina	6	100µl	intraperitoneal
G6	Controle positivo = G2	6	100µl	intraperitoneal
G7	NANO com PS GBS + proteína + vitamina	6	10 µl/15 µg de amostra	sublingual
G8	NANO com vitamina	6	10 µl/15 µg de amostra	sublingual

Após a coleta do soro, esse material biológico e a saliva, com 0,1% de inibidores de proteases, foram armazenados no freezer para análises posteriores de IgG e sIgA.

4.7 Análise estatística

Os soros dos camundongos imunizados foram avaliados individualmente e testados em triplicada para titulação de IgG sérica total. O resultado da titulação foi obtido pela determinação da dose efetiva (LEINIKKI e PASSILA 1977), onde o soro positivo foi construído através da inoculação intraperitoneal (Nanopartícula com polissacarídeo e OVA). A vantagem deste método de determinação é ser reprodutivo; suas desvantagens são o trabalho de cálculo e o método incomum de expressar resultado – este método assume o paralelismo da dose resposta.

Para IgA total, o método foi quantitativo, no qual foram determinados, para cada grupo de imunização, a média geométrica e o erro padrão da quantidade de sIgA na saliva.

Comparações entre os camundongos imunizados com o conjugado e os controles foram realizadas por análise de variância (ANOVA fator único), com ferramenta de Bonferrone. A significância estatística estabelecida foi de $p < 0,05$.

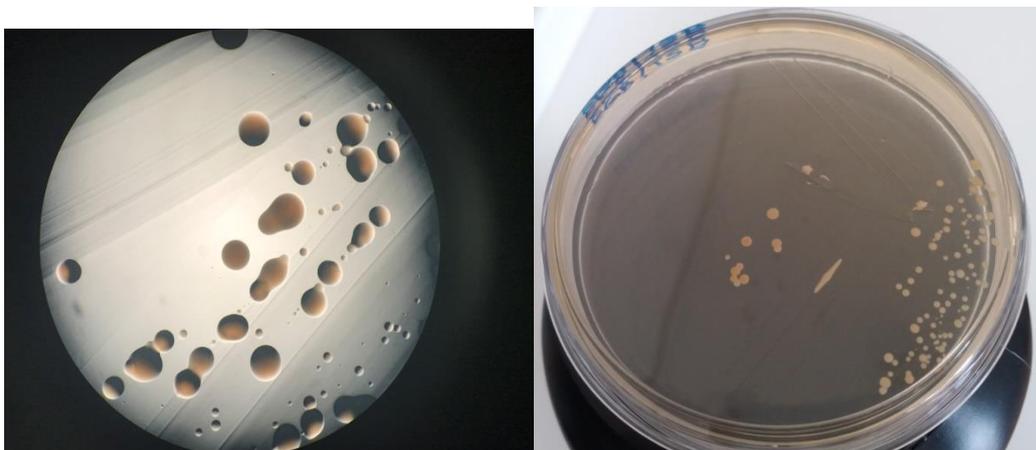
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da cepa: identificação, pureza e contaminação

As bactérias devem ser identificadas com base na sua morfologia e, também, testes bioquímicos ou técnicas moleculares, para garantir que não houve contaminação e que não houve desvios genotípico e fenotípico (GERAGHTY *et al.*, 2014).

O teste de Coloração de Gram foi realizado como método de análise de pureza bacteriana. A coloração de gram apresentou característica de *streptococcus*, coloração violeta azul típica de gram positivas.

Figura 12 Análise microscópica do GBS e placa das colônias cultivada em meio BHI de *Streptococcus agalactiae* Ia em forma de *coccus*



Na confirmação morfológica visual, o cultivo em meio BHI mostrou colônias de cor creme amarelado, uniformes e puras (figura 12).

A metodologia por MALDI-TOF MS, realizada em triplicata, confirmou a identificação da espécie para *Streptococcus agalactiae* realizada no equipamento Bruker Daltonik MALDI Biotyper (tabela 12).

Tabela 12 Identificação de espécie assumida (escore acima de 2); ou seja, identidade perfeita

Identificação	Score	Identificação	Score
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2.523	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2.394
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2.398	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2.347
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2.375	<i>Streptococcus agalactiae</i>	2.458

A análise de gene rRNA 16S foi positiva para *Streptococcus agalactiae*. A análise do sequenciamento final foi realizada pelo programa Blast e confirmou 99% de identidade com *Streptococcus agalactiae* strain QMA0271; e-value=0; % query cover 100% (tabela 13).

Figura 13 Resultado do sequenciamento realizado pelo programa Blast para identificação da análise de gene rRNA 16S do *Streptococcus agalactiae*

```
CTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCC
GAACTGAGATTGGCTTTAAGAGATTAGCTTGCCGTCACCGGCTTGCGACTCGTTGTAC
CAACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCA
TCCCCACCTTCCTCCGGTTTATTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTTAATGAT
GGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA
CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTCTGCTCCGAAGAGAAAGCCTATC
TCTAGGCCGGTCAGAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAAT
TAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCT
TGCGGTCTGACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTAAGCCCCG
GAAAGGGCCTAACACCTAACACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAA
TCCTGTTTGTCTCCCACGCTTTCTGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAAAGAGGCGC
TTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTATATCTACGCATTTCTCCGCTACACATGGAAGGTC
CACTCTCCCCTTCTGCACTCAAGTCCTCCAGTTTCCACAGCGTACAATGG
```

Tanto nos testes MALDI-TOF como no sequenciamento genômico, foi possível fazer a identificação do microrganismo, seguindo, assim, as normas de Boas Práticas de Cultivo de Microrganismos (WHO, 2011), com equipamentos qualificados, técnica analítica certificada, com profissionais experientes na área, garantindo, assim, bom controle do microrganismo e do banco mestre de cultivo.

A identificação de cepas bacterianas voltadas para a produção de vacina deve ter como base: as suas características morfológicas e seu padrão bioquímico referente à redução ou à oxidação de substâncias químicas. Estes ensaios garantem a pureza do extrato bacteriano que está sendo utilizado no processo produtivo. Além de garantir a pureza, os testes genotípicos confirmam a identidade da cepa utilizada.

A coloração de GRAM da cepa GBS sorotipo IA revelou suas características típicas: forma de *coccus*, coloração violeta azulada, sem a presença morfológica de outros microrganismos. Em ensaio de crescimento em meio de TPP Agar, foi possível visualizar apenas um tipo morfológico de colônia bacteriana, demonstrando sua uniformidade e sua pureza.

A estabilidade genética de microrganismos é uma grande preocupação para a segurança vacinal. O método MALDI-TOF tem sido utilizado como ferramenta de rotina no controle de qualidade, avaliação da estabilidade genética e monitoramento quantitativo de alterações genéticas em microrganismos. Os testes moleculares fornecem principalmente um indicador de consistência e quantificação de mutantes, controles importantes na produção de produtos biológicos (SHIN et al. 2007; e BANSAL, 2005).

5.2 Cultivo - Concentração celular (DO 600 nm) nos meios TSB e BHI

Para o crescimento celular do GBS, o Instituto Adolfo Lutz e o ATCC recomendam o uso dos meios de cultivo ATCC® Medium 44: *Brain Heart Infusion Agar/Broth* e o meio ATCC® Medium 260: *Trypticase soy agar/broth with defibrinated sheep blood*.

Seguindo os fundamentos regulatórios de Boas Práticas de Fabricação (RDC 69/2014 ANVISA), para garantir que o produto seja isento de contaminantes de origem animal, principalmente bovino e, consequentemente, a presença de *prions* responsáveis por desencadear Encefalomielite Espongiforme Bovina (EEB), optamos por escolher o meio de cultura a base de TSB sem sangue de carneiro desfibrinado, evitando a utilização de produtos de origem animal (tabela 14). Consequentemente, diminuindo o risco de infecção por agentes da encefalopatia espongiforme transmissível (EET).

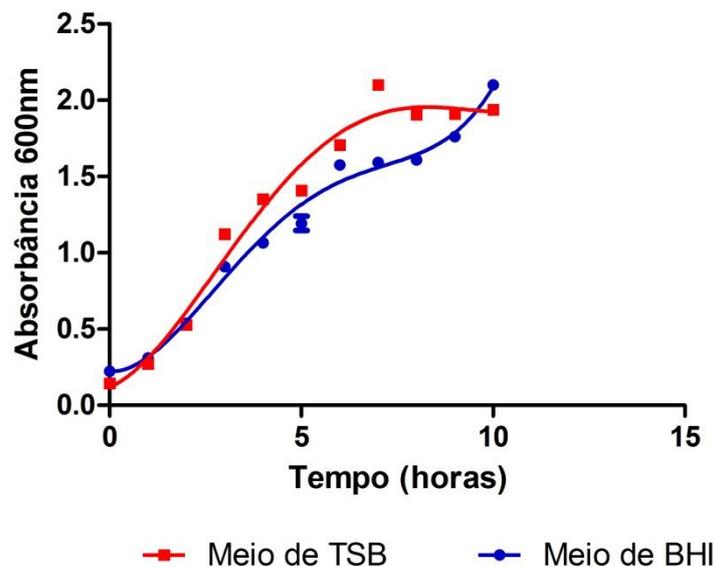
Tabela 13 Composição dos meios de cultura de BHI e TSB (fabricante Merck S.A.), utilizados para expansão do inóculo e fermentação, constantes no rótulo.

Infusão de Sangue (BHI) –g/L	Infusão de tripsina de soja (TSB) – g/L
Extrato de cérebro, extrato de coração e peptona 27.5g	Composição de peptona de caseína 17.0g
D(+)glicose 2.0g	Peptona de farinha de soja 13.0g
Cloreto de Sódio 5.0g	D(+) Glicose 2.5g
Hidróxido dissódico Fosfato 2.5g	Cloreto de Sódio 5.0g
	Hidroxido di-potassium Fosfato 2.5g

A análise do crescimento celular foi determinada por teste turbidimétrico com leitura a cada 1 hora do cultivo, com absorvância de 600 nm no equipamento Biophotometer Eppendorf (figura 13).

Os dados obtidos demonstram que não houve diferença estatística significativa: para o crescimento celular, entre o meio BHI e o meio TSB (P value 0,4417), entre a fase exponencial de crescimento ($P = 0,9691$), para o *double time* (tempo em horas para replicação bacteriana), pois, no meio BHI, ocorreu em 0,28/h e, no meio TSB, em 0,31/h; a taxa de velocidade específica de crescimento foi de 0,22 DO, para o meio TSB, e 0,15 DO, para o meio BHI.

Figura 14 Análise do crescimento celular dos meios de cultivo TSB e BHI – absorvância $n=600$ nm. Os dados obtidos demonstram que não houve diferença estatística significativa: para o crescimento celular, entre o meio BHI e o meio TSB (P value 0,4417), entre a fase exponencial de crescimento.



Assim, seguindo as boas práticas de produção de produtos biológicos, que não recomendam o uso de produtos de origem animal para evitar a contaminação por *prions*, o meio de cultura TSB é considerado o mais indicado para futuros cultivos e como meio de cultura a ser utilizado nas demais etapas deste projeto.

5.3 Escolha do meio TSB (infusão de tripsina de soja)

A composição dos meios é um fator importante no desenvolvimento de produtos biológicos. A Organização Mundial da Saúde e a ANVISA, órgão regulatório do Brasil, advertem que as vacinas para uso humano e veterinário, preparadas a partir de material bovino, podem apresentar risco de transmissão do agente EET (Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis). Por isso, as vacinas precisam ser controladas e as matérias de partida devem ser isentas de possíveis contaminantes. Essa regulamentação da ANVISA consta nas resoluções 305/02 e 68/03, que definem o controle de produto acabado para produtos biológicos e risco de contaminação por Encefalite Espongiforme Bovina (EEB).

A RDC 68, de 2003, estabelece que os produtos acabados, semielaborados ou a granel, pertencentes às classes de medicamentos, cosméticos e produtos para saúde, para uso em seres humanos, cujo material de partida seja obtido a partir de tecidos ou fluidos de animais ruminantes, também ficam sujeitos às medidas previstas nas resoluções 305/02 e 68/03 e devem apresentar prova de identidade.

A RDC 305/02 normatiza a classificação conforme categoria do tecido ou fluido de animais ruminantes e o risco geográfico. Todas as substâncias utilizadas no processo de fabricação ou composição do produto final (como, por exemplo, meios de cultura e ácido esteárico) devem ser monitoradas e devem ter sua origem comprovada no que concerne à isenção de contaminação.

Uma das exigências é que uma amostra do produto acabado da vacina ou produto biológico seja testada quanto a sua origem, frente a antissoros específicos e funcionantes de pelo menos quatro espécies diferentes (anti-humano, antibovino, antiequino, anticaprino ou antiporcino) por imunodifusão ou por imunoeletroforese, segundo metodologia descrita na última edição da Farmacopeia Europeia.

A amostra deve apresentar reatividade somente frente ao soro anti-humano. Os antissoros das demais espécies devem apresentar reatividade exclusivamente diante de seus antígenos específicos.

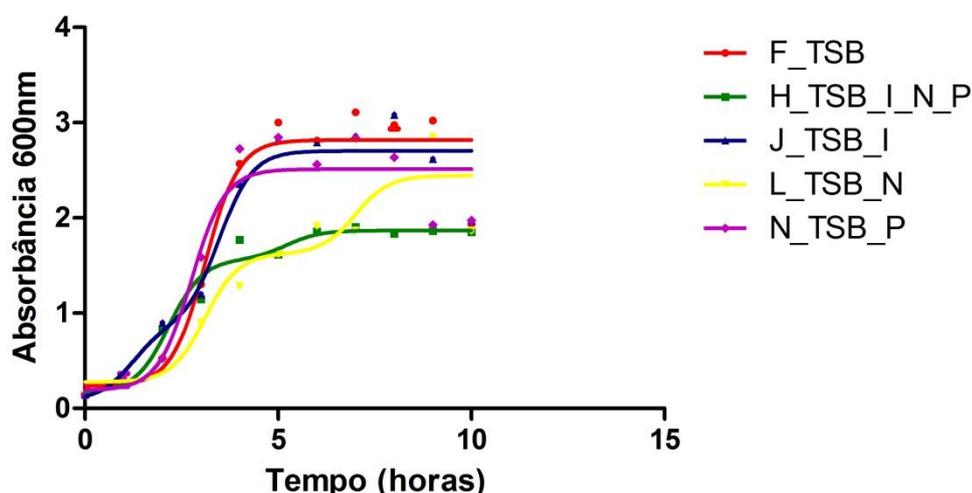
A partir do exposto, verificam-se as vantagens de se utilizar o meio TSB em relação ao meio BHI, pois como este meio contém caldo de sangue, os testes e os controles necessários seriam mais extensos, o que pode encarecer o processo.

5.4 Diferentes suplementos nutricionais em meio TSB

Ao estudar os mapas metabólicos para a síntese de açúcar, na plataforma Kegg, foram escolhidos três suplementos nutricionais que poderiam substituir, no meio de cultivo TSB, os produtos de origem animal e, conseqüentemente, melhorar o crescimento celular e a produção de cápsula polissacarídica. Inosina, L-Prolina e Ácido Nicotínico foram utilizados como suplementos individualmente e associados.

O crescimento celular foi avaliado (Figura 14) através de análise turbidimétrica a cada 1 hora, por espectrofotometria no equipamento Biophotometer Eppendorf, com absorvância a 600nm. Todas as análises foram realizadas em duplicatas.

Figura 15 Análise do crescimento celular no meio de cultura TSB com diferentes suplementos nutricionais (I - Inosina, P - L-Prolina, N – Ácido Nicotínico)



Pela análise de variância ANOVA, não houve diferença estatística significativa no crescimento celular utilizando-se diferentes suplementações. Porém, o meio suplementado com L-Prolina apresentou um *double time* de 0,14/h (8,4 min) em relação aos outros suplementos ou isento de suplemento. O meio que continha os três suplementos (Inosina, L-prolina e ácido nicotínico) resultou em *double time* 0,17/h (10,2 min).

Aplicou-se a ferramenta de Bonferroni (tabela 15) para análise de comparabilidade entre as curvas de crescimento celular.

Tabela 14 Análise estatística de Bonferroni com os três suplementos (Inosina, L-PRolina e ácido nicotínico)

Teste comparativo	Significante?	
Bonferroni's	P < 0,05?	Resumo
F_TSB vs H_TSB_I_N_P	Sim	**
F_TSB vs J_TSB_I	Não	ns
F_TSB vs L_TSB_N	Sim	**
F_TSB vs N_TSB_P	Não	ns
H_TSB_I_N_P vs J_TSB_I	Sim	**
H_TSB_I_N_P vs L_TSB_N	Não	ns
H_TSB_I_N_P vs N_TSB_P	Sim	*
J_TSB_I vs L_TSB_N	Sim	*
J_TSB_I vs N_TSB_P	Não	ns
L_TSB_N vs N_TSB_P	Não	ns

Analisando as diferenças entre os diferentes suplementos, pode-se identificar que o meio TSB sem suplementação apresentou diferença estatística significativa com o meio suplementado com os três diferentes nutrientes concomitantes (ácido nicotínico, L-prolina e inosina). Assim como com o meio suplementado apenas com ácido nicotínico comparado com o meio com inosina, houve piora na curva de crescimento. Podemos afirmar que, quando ocorreu a suplementação dos três diferentes nutrientes, não ocorreu melhora no crescimento, mas desordem na rede metabólica.

Após o final do processo, a biomassa foi quantificada, como demonstrado na Tabela 16.

Tabela 15 Quantificação da biomassa seca produzida (mg/ml) com o meio TSB e com os diferentes suplementos I (inosina), N (ácido nicotínico), P (L-prolina) e I_N_P (composição dos três nutrientes)

Meio de cultura	Biomassa em mg/ml
F_TSB	0,92±0,04
H_TSB_I_N_P	0,51±0,015
J_TSB_I	0,62±0,039
L_TSB_N	0,51±0,028
N_TSB_P	1,13±0,048

A princípio, o meio contendo L-Prolina foi o que resultou maior quantidade de biomassa, como demonstrado na Tabela 16 acima. Sendo assim, houve tendência de se utilizar o meio TSB associado à L-prolina para todos os experimentos seguintes.

Cada rota metabólica gera diferentes energias de potencial de redução, entre doador de elétron inicial e acceptor final, acarretando em diferentes produções de energia na forma de ATP, ocorrendo assim rendimento energético diferente e, conseqüentemente, taxa de crescimento do microrganismo diferente para cada suplemento adicionado.

A escolha dos suplementos pode modificar os mecanismos de indução e de repressão que controlam a formação de diversas enzimas-chave em processos biossintéticos. A repressão interrompe a formação de uma enzima crucial para um produto a partir de uma sequência metabólica, enquanto que a intensidade de síntese de uma enzima é analisada a partir do conceito de indução.

Analisando o Banco de Dados Kegg de vias metabólicas e as diferentes rotas divergentes e convergentes utilizadas pelo microrganismo *Streptococcus agalactiae* A909, seria possível propor um modelo que melhore as rotas catabólicas e anabólicas e a maneira como repressar ou induzir a produção de intermediários.

O Banco de Dados Kegg também colaboraria para elucidar os fatores cinéticos e como estes se correlacionam com os fatores estruturais. A regulação de um percurso metabólico pode ocorrer em diversos níveis, como a partir das concentrações de nutrientes disponíveis, concentrações de enzimas constitutivas e de enzimas induzidas (sintetizadas apenas como resposta à presença de determinados substratos) que catalisam e determinam as reações consecutivas.

Mais estudos precisam ser conduzidos para elucidar como usar o Banco de Dados Kegg para a produção de biomassa e aumento de rendimento na produção de cápsula polissacarídica.

5.5 Avaliação da produção de cápsula polissacarídica

A produção de cápsula polissacarídica em meio suplementado foi analisada a partir da metodologia de fenol sulfúrico, utilizando-se o açúcar arabinose como padrão.

Tabela 16 Concentração de polissacarídeo ($\mu\text{g/ml}$) no meio TSB adicionado com os diferentes suplementos e a relação de concentração de polissacarídeo por biomassa

TSB mais suplemento	CPS ($\mu\text{g/ml}$)	Relação de concentração de PS (mg/ml) por biomassa (mg)
P+I+N	7,096	0,71
I	13,859	1,39
N	6,782	0,68
P	18,52	1,85
TSB	11,168	1,12

Apesar da L-Prolina ter mostrado uma curva de crescimento menor do que o TSB sozinho e o TSB com Inosina, a relação de concentração de PS/biomassa foi maior com o meio contendo L-Prolina, confirmando a via convergente do Banco de Dados do Kegg.

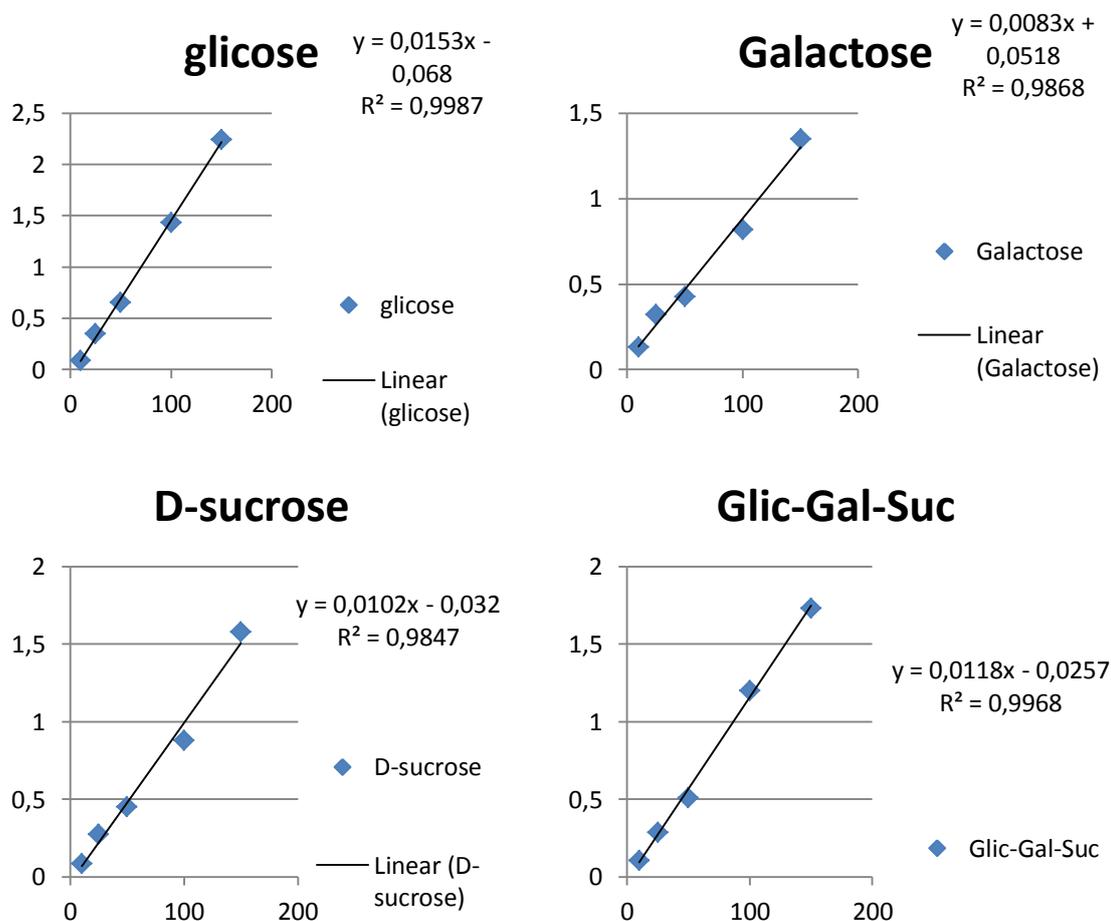
Por este motivo, foi escolhido o suplemento com L-prolina, devido à produção de biomassa ser ligeiramente maior do que a dos outros meios e relação de concentração PS/biomassa também ser maior.

Após cultivo e nova purificação com L-Prolina foi realizada a dosagem de polissacarídeo.

5.6 Avaliação da purificação com L-prolina no meio de cultura TSB

A concentração de polissacarídeo total determinada pelo método fenol-sulfúrico. Foram utilizados como padrão de referência, os seguintes açúcares: Glicose, Galactose, Sucrose e a mistura destes três componentes na proporção 2:2:1 (figura 15). A concentração foi calculada pela média dos valores absolutos obtidos em cada curva padrão.

Figura 16 Curvas padrões de glicose, galactose e sucrose, bem como a mistura dos três na proporção 2:2:1



A escolha dos padrões de açúcares teve como base as análises de cromatografia gasosa e pelos estudos conduzidos por outros pesquisadores como: Kogan e colaboradores (1996), que descrevem o polissacarídeo *streptococcus* grupo B sorotipo VIII contendo D-glicose, D-galactose, L-ramnose e ácido siálico na razão molar 1: 1: 1: 1. e os estudos de Berti e colaboradores (2014) e Yamamoto *et al* 1999o GBS sorotipo IX contendo: Glcp, glucose; Galp, galactose; GlcpNAc, N-acetylglucosamine; GlcpN, glucosamina; NeupNAc, N-ácido acetylneuraminico.

Pela análise fenol sulfúrico, calculou-se a concentração de polissacarídeo a partir de uma cultura de 50 ml. Foi obtido em média 114,43 µg de polissacarídeo purificado (2,4 µg/ml).

Figura 17 Dosagem de polissacarídeo a partir do método fenol sulfúrico e leitura em espectrofotômetro (meio de cultura utilizado: TSB suplementado com L-Prolina)

Açúcar	µg/ml
Glicose	113,00
Galactose	88,00
D-Sucrose	140,08
Mistura	116,64
Média	114,43

A determinação da presença de ácido nucléico foi realizada por espectrofotometria de UV em absorvância 260nm; a concentração foi abaixo do limite de detecção do método (µg/mL).

Também foi determinada a concentração de proteína por método colorimétrico (BCA) e por eletroforese em poliacrilamida na presença de SDS. Em ambos os métodos, não foram detectadas proteínas dentro dos limites de quantificação e detecção (5µg/mL)

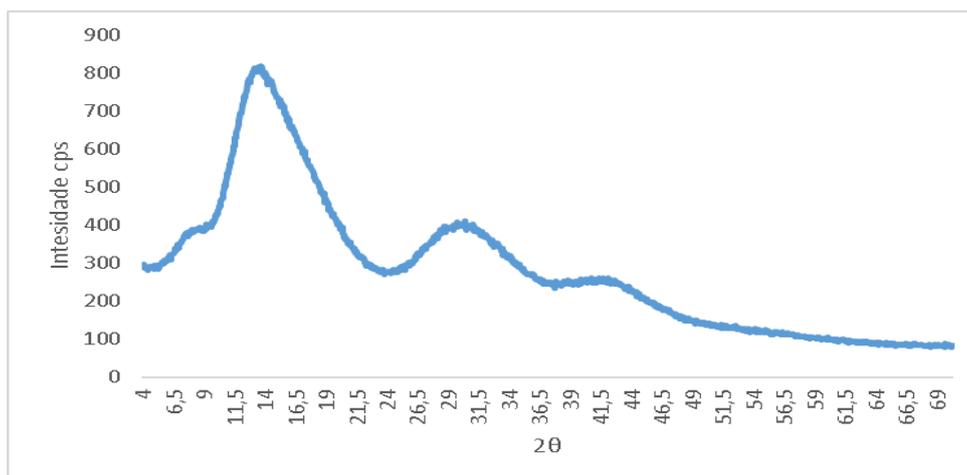
Identificação de cristalinidade - Difração de Raios-X

A difração de raios-X foi realizada para caracterização e identificação da cristalinidade do PS ou amorfologismo.

Para materiais cristalinos, a análise de difração de raios X caracteriza as diferentes fases e colabora para identificação dos componentes químicos e da estrutura morfológica através da verificação das distâncias interplanares.

A técnica de difração de raios-X pode esclarecer se o processo de purificação foi eficaz, pois, a partir do Banco de Dados, pode-se detectar sais e contaminantes.

Figura 18 Difração de raios x do PS após serem realizados novo cultivo e purificação



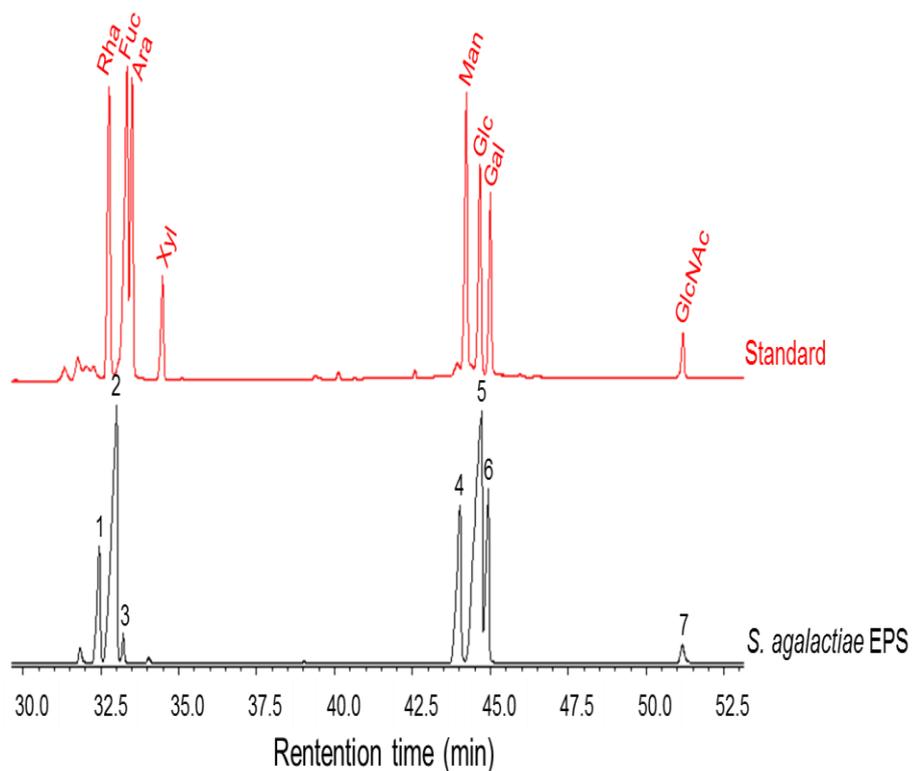
O padrão de difração de raios X não mostrou nenhum pico característico, o que indica que a estrutura é completamente amorfa. Os resultados mostram que o polissacarídeo isolado apresenta comportamento semelhante a outros isolados polissacarídicos (SUMATHI, 2002; KONG *et al.*, 2015; DOGAN *et al.*, 2015).

Metodologia analítica para identificação da composição monossacarídica – cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa foi utilizada para identificação da composição monossacarídica e posteriormente a técnica de NMR (espectroscopia de ressonância magnética nuclear) para determinação da estrutura.

Os resultados da composição monossacarídica, que foram obtidos a partir da reação de acetilação e análise por cromatografia gasosa, identificou ramificações de fucose, manose, glicose, galactose e N-acetil-glucosamina

Figura 19 Picos cromatográficos a partir da reação de acetilação para identificação da identidade através da análise por cromatografia gasosa



A partir da análise da porcentagem de composição (tabela 18), verificou-se que o PS produzido por esse microrganismo trata-se de uma *Rhamnoglucana* bem heterogênea, contendo ramificações de fucose, manose, glicose, galactose e N-acetil-glucosamina. A composição de açúcares está consonante com os trabalhos realizados por Berti *et al.* (2014) e Yamamoto *et al.* (1999).

Tabela 17 Composição do PS do *Streptococcus agalactiae* Ia a partir da reação de acetilação para identificação da identidade através da análise por cromatografia gasosa

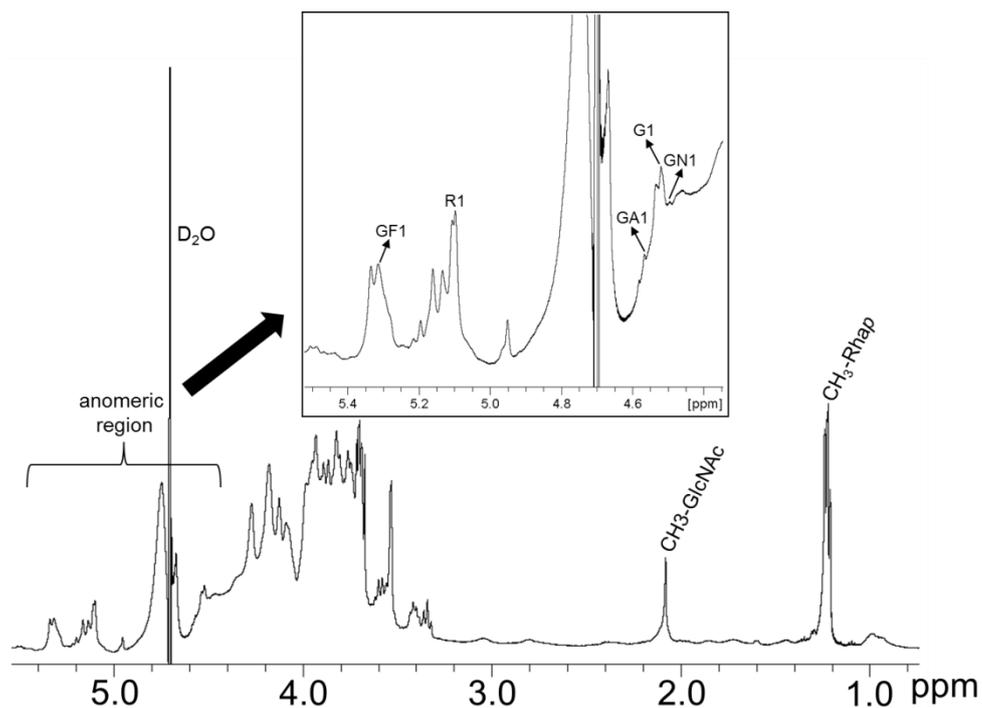
Peak	Ret. time	Star time	End time	m/z	Area	Area %	Height	Height %	A/H	Monômeros
1	32.660	32.433	32.767	TIC	12323680	7.50	1627925	11.66	7.57	7,5%
2	33.217	32.767	33.325	TIC	46633543	28.38	3621285	25.95	12.87	Rhamnose 28,38%
3	33.425	33.325	33.533	TIC	1910563	1.16	392172	2.81	4.87	Fucose 1,16% (traços)
4	44.231	43.917	44.383	TIC	21675849	13.19	2211533	15.84	9.80	Mannose 13,19%
5	44.917	44.383	45.000	TIC	61606058	37.50	3454406	24.74	17.83	Glucose 37,5%
6	45.144	45.000	45.425	TIC	17679338	10.76	2405611	17.23	7.34	Galactose 10,76%
7	51.090	50.900	51.425	TIC	2476276	1.51	247418	1.77	10.00	N-Acetyl glucosamina 1,15% (traços)

Metodologia analítica para identificação da estrutura – ressonância magnética (NMR)

Foi realizada a análise da estrutura do GBS a partir da metodologia de NMR. Segue o espectro 1D ¹H/¹³C HSQC editado do polissacarídeo extraído da parede celular de *Streptococcus agalactiae* (sorotipo Ia).

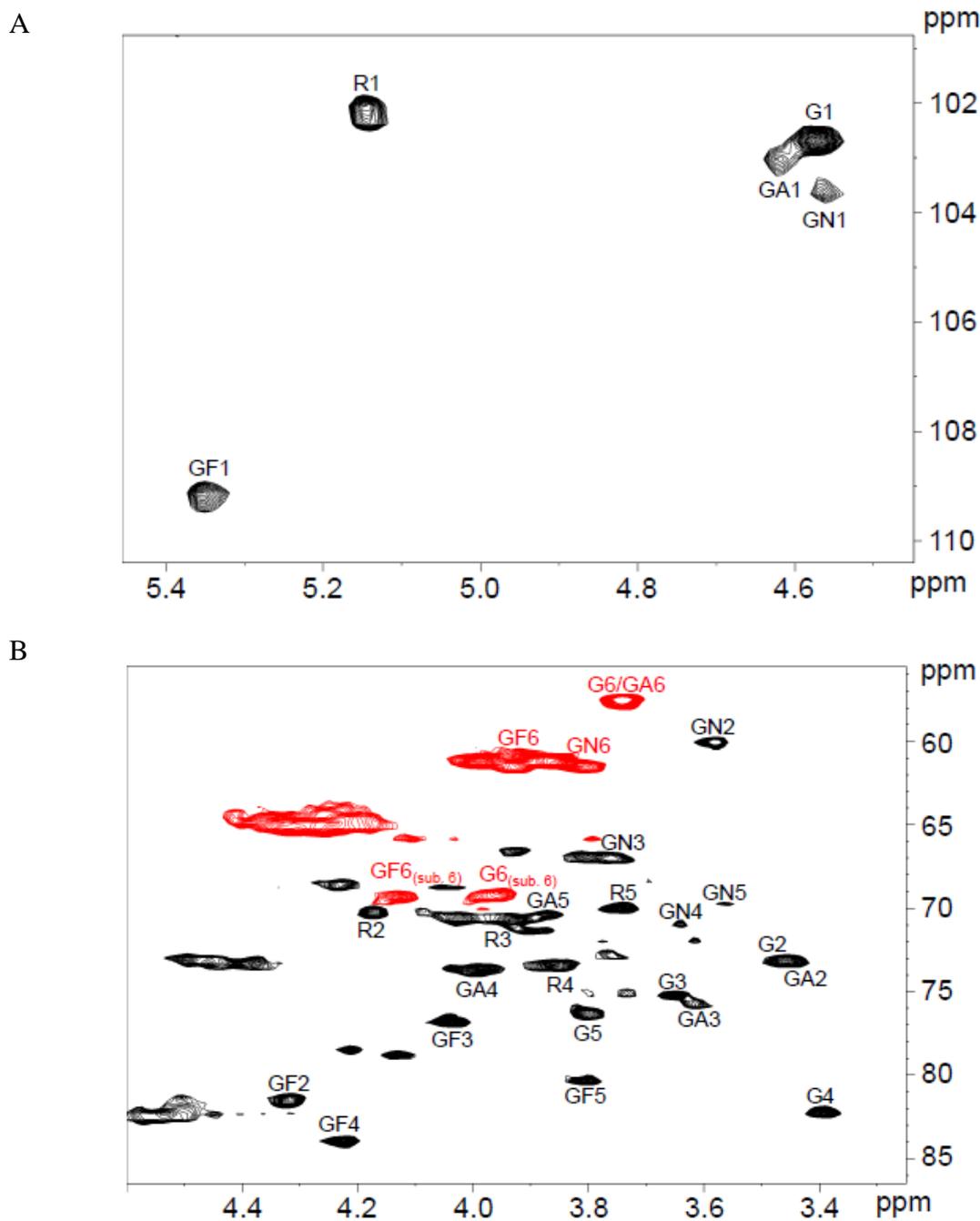
Berti e colaboradores (2014) identificaram os açúcares do GBS sorotipo IX através do espectro de RMN ¹H do polissacarídeo capsular, e estes dados foram utilizados para a nossa proposta da estrutura.

Figura 20 Espectro 1D do polissacarídeo extraído da parede celular de *Streptococcus agalactiae* (sorotipo Ia). A região dos sinais anoméricos foi magnificada para melhor visualização. Os sinais designados como GF1, R1, GA1, G1 e GN1 referem-se aos sinais dos prótons anoméricos β -D-Glcf, α -L-Rhap, β -D-Galp, β -D-Glcp e β -D-GlcpNAc, respectivamente. Ver Tabela 19 para mais informações relacionadas ao deslocamento químico $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ das unidades de β -D-glicofuranose, α -L-ramnopiranosose, β -D-galactopiranosose, β -D-glicopiranosose e β -D-N-acetil-glicopiranosamina.



A região dos sinais anoméricos foi magnificada para melhor visualização.

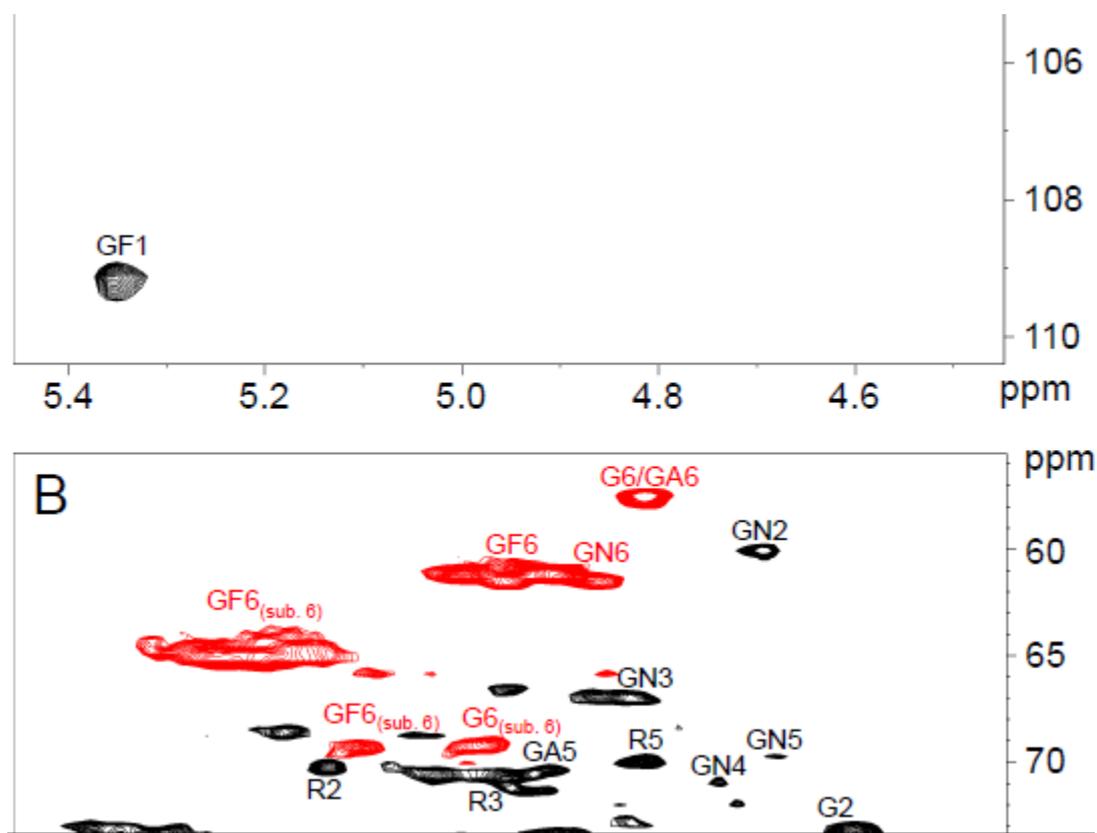
Figura 21 Caracterização NMR por 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQCed (A) e sinais anoméricos magnificados para melhor visualização dos sinais (B).



No painel A, a região dos sinais anoméricos foi magnificada para melhor visualização dos sinais. No painel B, a região típica dos sinais do anel de açúcares mostra o assinalamento dos principais resíduos identificados. A nomenclatura dos sinais encontra-se descrita na Figura 20. Ver a tabela 19 para mais informações relacionadas ao deslocamento químico $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ das unidades de β -D-glicofuranose, α -L-ramnopirranose, β -D-galactopirranose, β -D-glicopirranose e β -D-N-acetil-glicopiranosamina.

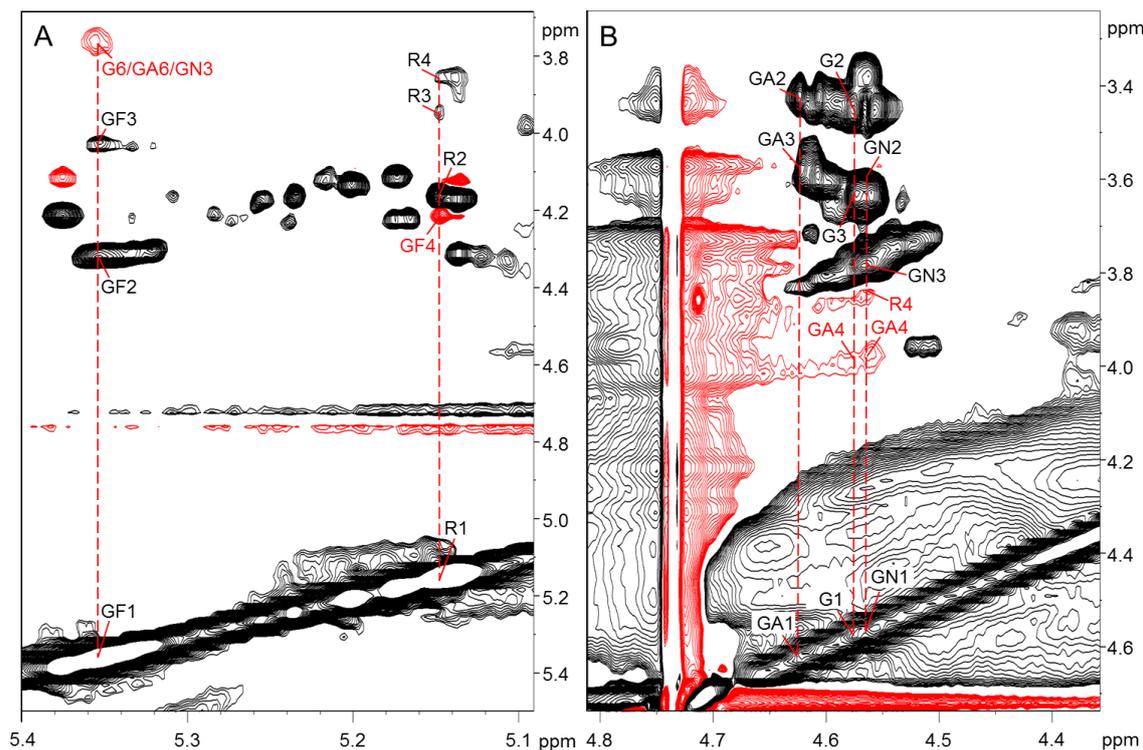
A região típica dos sinais do anel de açúcares mostra o assinalamento dos principais resíduos identificados.

Figura 22 Espectro 2D $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ HSQC editado do polissacarídeo extraído da parede celular de *Streptococcus agalactiae* (sorotipo Ia). No painel A, a região dos sinais anoméricos foi magnificada para melhor visualização dos sinais. No painel B, a região típica dos sinais do anel de açúcares mostra o assinalamento dos principais resíduos identificados. A nomenclatura dos sinais encontra-se descrita na Figura 20. Ver Tabela 18 para mais informações relacionadas ao deslocamento químico $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ das unidades de β -D-glicofuranose, α -L-ramnopiranoose, β -D-galactopiranoose, β -D-glicopiranoose e β -D-N-acetil-glicopiranosamina.



O espectro 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ phase-TOCSY do polissacarídeo extraído da parede celular de *Streptococcus agalactiae* (sorotipo Ia) mostra as correlações intra e inter-resíduos identificadas para β -D-glicofuranose, α -L-ramnopiranoose, β -D-galactopiranoose, β -D-glicopiranoose e β -D-N-acetil-glicopiranosamina

Figura 23 Espectro de caracterização de NMR por 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ phase-TOCSY do exopolissacarídeo extraído da parede celular de *Streptococcus agalactiae* (sorotipo Ia). Ambos os painéis, A e B, correspondem à região dos sinais anoméricos identificados para a amostra. No painel A, são mostradas as correlações intra e inter-resíduos identificados para β -D-Glicofuranose e α -L-Ramnopiranoose, enquanto, no Painel B, são mostradas as correlações intra e inter-resíduos identificadas para β -D-Galactopiranoose, β -D-Glicopiranoose e β -D-N-acetil-Glicopiranosamina. Ver Tabela 18 para mais informações relacionadas ao deslocamento químico $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ das unidades assinaladas.



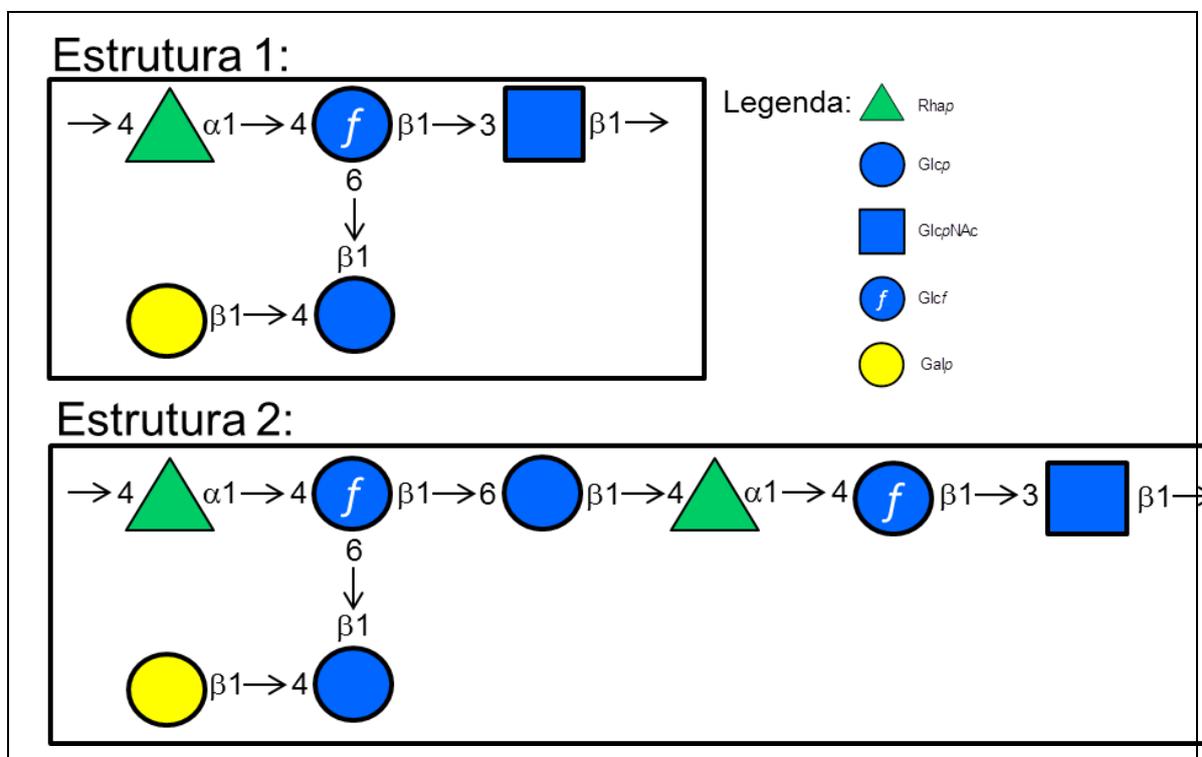
O deslocamento químico $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (ppm) das unidades de α -L-ramnopiranoose, β -D-glicopiranoose, β -D-galactopiranoose, β -D-glicofuranose e β -D-N-acetilglicopiranosamina identificadas na estrutura do polissacarídeo extraído da parede celular de *Streptococcus agalactiae* (sorotipo Ia).

Tabela 18 Deslocamento químico $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ (ppm) das unidades de β -D-glicofuranose, α -L-ramnopiranosose, β -D-galactopiranosose, β -D-glicopiranosose e β -D-N-acetil-glicopiranosamina identificadas na estrutura do exopolissacarídeo extraído da parede celular de *Streptococcus agalactiae* (sorotipo Ia.). Os sinais em *itálico* representam as ligações glicosídicas identificadas no espectro 2D $^1\text{H}/^1\text{H}$ phase-TOCSY.

Sinais	$\rightarrow 4\alpha\text{Rhap1} \rightarrow$ (un. R)	$\rightarrow 4,6\beta\text{Glc}p1 \rightarrow$ (un. G)	$\rightarrow 4\beta\text{Gal}p1 \rightarrow$ (un. GA)	$\rightarrow 4,6\beta\text{Glc}f1 \rightarrow$ (un. GF)	$\rightarrow 3\beta\text{Glc}p\text{NAc1} \rightarrow$ (un. GN)
H1/C1	5.14/102.3	4.57/102.7	4.63/103.0	5.36/109.1	4.56/103.6
H2/C2	4.17/70.0	3.45/73.2	3.40/73.2	4.31/81.3	3.58/59.9
H3/C3	3.93/70.6	3.64/75.2	3.61/75.8	4.03/76.8	3.75/67.1
H4/C4	3.86/73.2	3.38/82.3	3.98/73.5	4.22/83.9	3.64/70.1
H5/C5	3.74/70.0	3.80/76.1	3.88/70.3	3.80/80.3	3.56/69.7
H6/C6	-	3.74/57.4 ; 3.95/69.0	3.74/57.4	3.90/61.2 ; 4.12/69.3	3.86/61.2
CH_2	1.26/16.9				2.12/22.1

Foram propostas duas possíveis estruturas aproximadas para o polissacarídeo extraído da parede celular de *Streptococcus agalactiae* (sorotipo Ia.). As estruturas (figura 23) foram montadas com base nos dados obtidos através dos experimentos de NMR e CGMS.

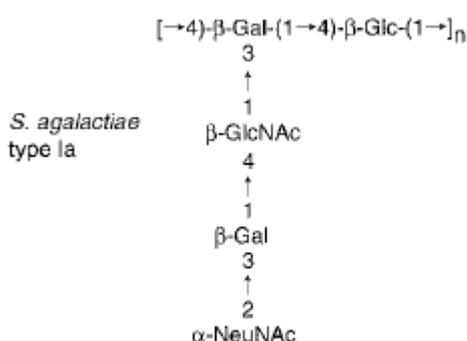
Figura 24 Estruturas aproximadas para o polissacarídeo extraído da parede celular de *Streptococcus agalactiae* (sorotipo Ia.). As estruturas 1 e 2 correspondem às duas possíveis cadeias que fazem parte da composição da estrutura deste polissacarídeo. As estruturas foram montadas com base nos dados obtidos através dos experimentos de NMR e CGMS.



Comparando a estrutura da cadeia proposta com o trabalho realizado por Yamamoto e colaboradores (1999) – figura abaixo - pode-se identificar que os açúcares

são semelhantes, mas a estrutura capsular diverge. Esta diferença pode ser proveniente do meio de cultivo utilizado, meio Todd-Hewitt - Becton Dickinson –contendo 3,1g de infusão de coração, 20g peptona, 2g dextrose, 2g cloreto de sódio, 0,4g de fosfato de sódio e 2,5g de carbonato sódico em um litro, suplementado com 2% glicose e 1.5% Na₂HPO₄, que possivelmente estimulou rotas metabólicas divergentes e consequentemente a construção da estrutura da cadeia polissacarídica.

Figura 25 Cadeia estrutural proposta pelo trabalho realizado por Yamamoto e colaboradores (1999) na qual, pode-se identificar que a maioria dos açúcares são semelhantes, mas a estrutura capsular diverge da nossa proposta.



5.7 Liofilização do polissacarídeo

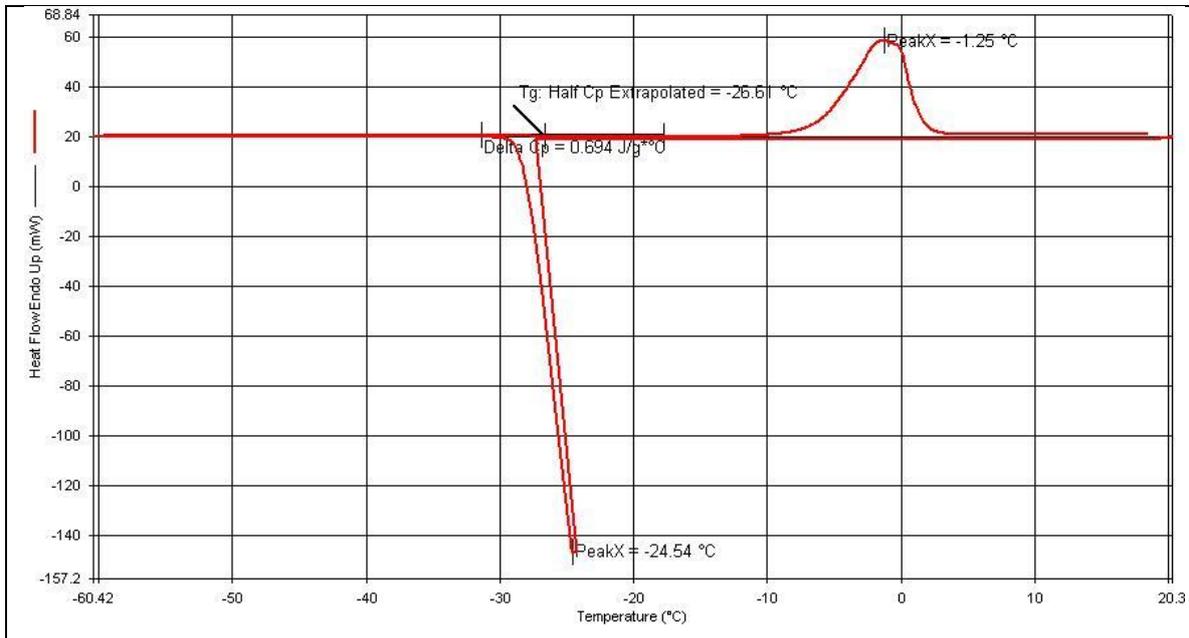
A liofilização, secagem por congelamento e sublimação, aumenta a estabilidade de produtos biológicos e farmacêuticos, inibindo as vias de degradação química, microbiológicas e física que ocorrem na presença de umidade, principalmente quando ocorrem longos períodos de armazenamento ou transporte.

O congelamento apropriado também influencia no *cake* do produto (aparência) e na qualidade final do produto. As técnicas de Calorímetro Exploratório Diferencial - DSC e Lyostat colaboram para identificar os parâmetros a serem utilizados posteriormente na liofilização e otimizar o processo.

A análise de DSC (Calorímetro Exploratório Diferencial) identificou que, na solução de polissacarídeo, as temperaturas foram:

- Tf = -1,25°C (temperatura de fusão)
- Te = -24,54°C (temperatura eutética)
- Tg = -26,61°C (transição vítrea)

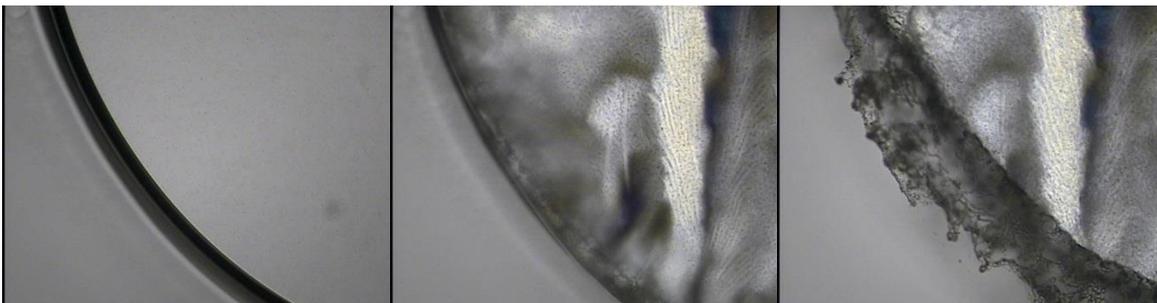
Figura 26 Análise de DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) com a identificação de temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão e temperatura eutética.



O PS por ter uma estrutura amorfa, não tem uma rede cristalina que sofrerá de maneira uniforme o congelamento e nucleação, conseqüentemente tem uma faixa de transição estrutural, sendo sua temperatura de transição vítrea $-26,6^\circ\text{C}$. Estes parâmetros de liofilização são muito importantes para um maior controle na nucleação, que influencia na textura do material congelado e nas características morfológicas finais do produto seco. Neste caso, para se controlar a nucleação, a redução do tempo da secagem primária é importante, garantindo-se a uniformidade do congelamento.

A análise do PS por microliofilização Lyostat determinou a temperatura de colapso em $-33,7^\circ\text{C}$.

Figura 27 Análise da temperatura de colapso pelo Lyostat. (A) Temperatura ambiente –líquido $+25^\circ\text{C}$, (B) Temperatura eutética -23.1°C (C) Temperatura de colapso $-33,7^\circ\text{C}$.



A temperatura de congelamento obtido pelo Lyostat foi de $-23,1^{\circ}\text{C}$ – que não difere muito do obtido pela técnica de DSC ($-24,54^{\circ}\text{C}$). A partir da análise acima, o processo de liofilização foi definido utilizando-se os parâmetros achados:

Tabela 19 Ciclo de congelamento e ciclo de secagem a partir dos parâmetros obtidos no DSC e Liostat

Ciclo de congelamento				
Passos	Rampa em $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Temperatura “Shelf” a $^{\circ}\text{C}$	Manter por:	
1	1,0	-40°C	60 min	
2	1,0	-35°C	60 min	
Ciclo de secagem				
Passos	Rampa em $^{\circ}\text{C}/\text{min}$	Temperatura “Shelf” a $^{\circ}\text{C}$	Manter por:	Com vácuo em mT
1	2,5	-35°C	300 min	100
2	2,5	15°C	240 min	100

Figura 28 Aparência final do *cake* liofilizado do PS



5.8 Taxa de encapsulamento indireta por determinação de proteína acoplada

Foi realizada uma mistura 1:1 de polissacarídeo com OVA, com o objetivo de realizar um acoplamento por interação molecular (tipo força iônica ou força de Van der

Walls). Desta forma foi medida a taxa de encapsulamento em relação à OVA, uma vez que se a eficiência da taxa de encapsulamento fosse realizada pela dosagem de PS, o método de fenol sulfúrico não seria recomendado, pois teria a interferência da própria quitosana.

Utilizou-se o padrão BSA para determinação da curva padrão. A capacidade de encapsulamento em relação à OVA foi de 92,8% dos grupos que continham PS. De acordo com Bexiga (2018), a eficiência de encapsulação da ovalbumina, em carboximetilquitosana medida por espectroscopia de fluorescência usando Ova-FITC foi de 17%. Para Gonzales (2015) foi de 30,9% com OVA e Yoshida (2012) foi de 88,7% com BSA, em Nanopartícula de quitosana. Para Bexiga (2018), a baixa taxa de encapsulamento pode ser atribuído ao ponto isoelétrico da ovalbumina (4.7) carregado negativamente sob as condições de preparação (~pH 7), que gera uma repulsão elétrica entre ovalbumina e carboximetilquitosana também carregada negativamente sob o pH da síntese de nanopartículas. Provavelmente obtivemos uma boa taxa de encapsulamento devido a presença de polissacarídeo que altera as cargas de superfície da OVA.

5.9 Análise de espalhamento dinâmico da luz (DLS)

As formulações antigênicas em frente aos grupos de imunização G2, G3, G4, G7 tiveram avaliados o tamanho de Nanopartícula e índice de polidispersão por espalhamento da luz no instrumento Zetasizer Nano S (Malvern) a 25°C e o potencial Zeta por eletroforese (Zetasizer Nano S Malvern)

Na Tabela 20, foram apresentados os resultados de diâmetros hidrodinâmicos medidos por DLS. As NPs-vazias (nanopartículas vazias) mostraram diâmetro menor do que quando encapsuladas com PS, proteína ou vitamina.

Tabela 20 Tamanho médio e índice de polidispersão (PdI) das Nanopartícula de quitosana 2mg/ml e TPP 1 mg/ml nos diferentes grupos de imunização

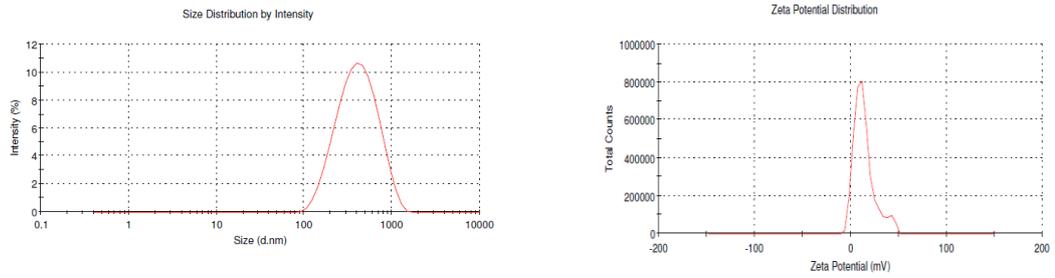
	Descrição	Zeta potencial (mV)	Z-Average (d.nm)	PdI
G2	Nano com PS +Pr	+13,9	338,2	0,235
G3	Nano com PS	+36,2	331,6	0,192
G4	Nano vazia	+39,7	184,8	0,243
G7	Nano com PS +Pr + Vit	+37,9	358,8	0,224
G8	Nano com Vit	+38,0	363,80	0,254

O índice de polidispersão está dentro do esperado (abaixo de 0.3) que demonstra a distribuição de diâmetro hidrodinâmico bimodal.

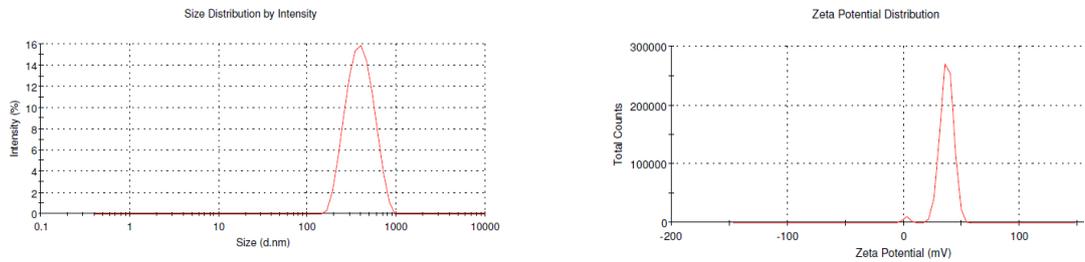
As figuras abaixo mostram os dados brutos de obtenção da distribuição do potencial Zeta e distribuição do tamanho por intensidade.

Figura 29 Dados brutos de obtenção do potencial Zeta e distribuição do tamanho de partícula

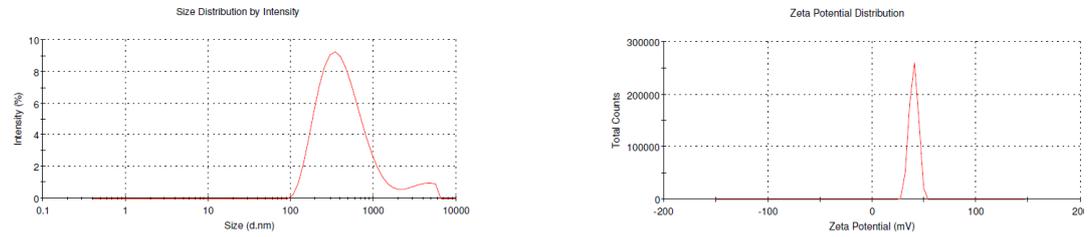
G2



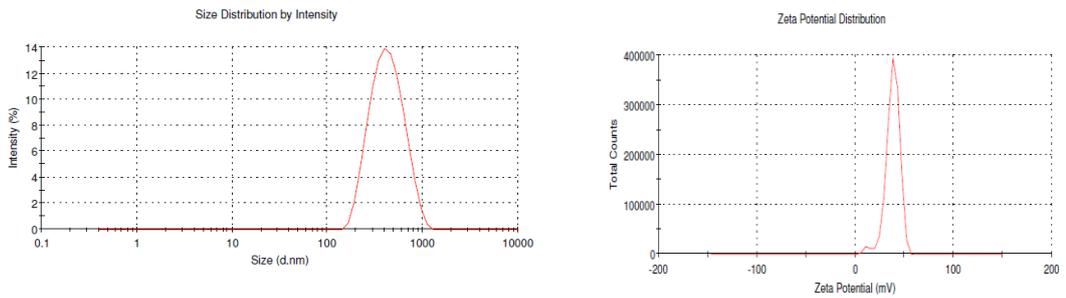
G3



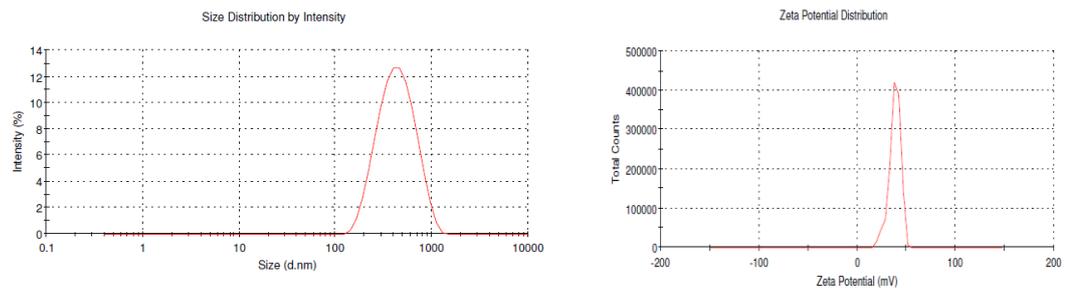
G4



G7



G8

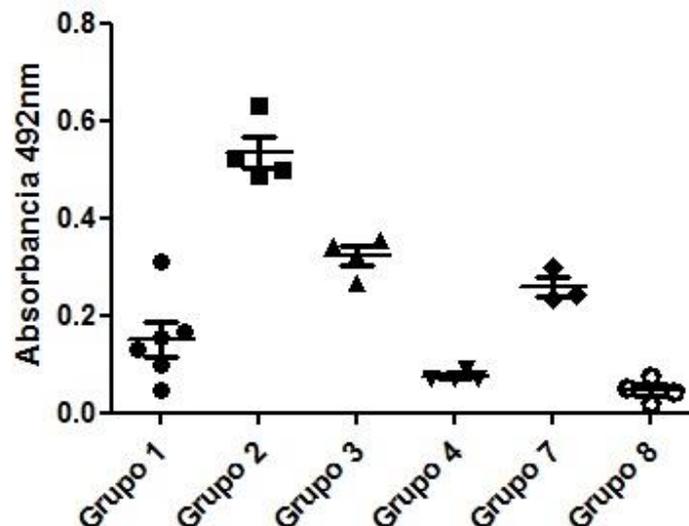


5.10 Análise da resposta imune

Foi realizado o teste imunoenzimático para avaliar a resposta de anticorpo IgG específicos contra o antígeno de PS e a resposta de anticorpo sIgA no epitélio das mucosas.

A produção de IgG da terceira sangria (21 dias após a primeira imunização) dos camundongos foi analisada. Os grupos imunizados apresentaram diferença estatística pela análise de variância do teste IgG sérica. O teste IgG sérica total mostrou que o grupo G2 (Nanopartícula com Polissacarídeo e Proteína acoplados) foi o que teve maior reatividade no teste de ELISA. Pela comparação múltipla de Bonferroni, o grupo 2 apresentou diferença estatística de todos os outros grupos (valor $p=0.0001$). O grupo 7 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo 3 e o grupo 3 e 7 apresentaram diferença significativa com todos os grupos com exceção da diferença entre eles. O grupo 1, 4 e 8 apresentaram resultados esperados, pois não apresentaram título suficiente para reagir com o polissacarídeo. Os grupos 5 e 6 foram utilizados como grupo de controle negativo e positivo respectivamente.

Figura 30 Título de anticorpos séricos IgG total



O uso da vitamina B, que foi utilizada para ativar uma classe de células imunes tipo T chamadas de MAIT (*mucosa associated invariant*), e que estimularia o sistema imunológico para a diferenciação de células, não resultou na resposta esperada.

Provavelmente, a acoplação molecular não foi eficiente e há necessidade de realizar novos testes para quantificação química de cada componente na Nanopartícula.

Tabela 21 Análise estatística de Bonferrone entre os grupos imunizados, avaliando-se o título de anticorpo sérico IgG contra polissacarídeo.

Teste múltiplo comparativo de Bonferroni's	Significante? P < 0.05?	Resumo
Grupo 1 vs Grupo 2	Sim	***
Grupo 1 vs Grupo 3	Sim	**
Grupo 1 vs Grupo 4	Não	ns
Grupo 1 vs Grupo 7	Não	ns
Grupo 1 vs Grupo 8	Não	ns
Grupo 2 vs Grupo 3	Sim	***
Grupo 2 vs Grupo 4	Sim	***
Grupo 2 vs Grupo 7	Sim	***
Grupo 2 vs Grupo 8	Sim	***
Grupo 3 vs Grupo 4	Yes	***
Grupo 3 vs Grupo 7	No	ns
Grupo 3 vs Grupo 8	Yes	***
Grupo 4 vs Grupo 7	Yes	**
Grupo 4 vs Grupo 8	No	ns
Grupo 7 vs Grupo 8	Yes	**

A vacinação sublingual induziu anticorpos sIgA no epitélio das mucosas bucais, que indica que houve estímulo pela vacina nas células do NALT de IgA secretora.

A partir da análise de variância no teste IgA, pode-se verificar diferença estatística entre os grupos. O teste IgA mostrou que o grupo G2 (Nanopartícula com Polissacarídeo e Proteína acoplados) foi o que teve maior produção de IgA, seguidos pelos grupo 7 (nanopartícula acoplado com PS e Proteína).

Figura 31 Concentração de anticorpos sIgA total

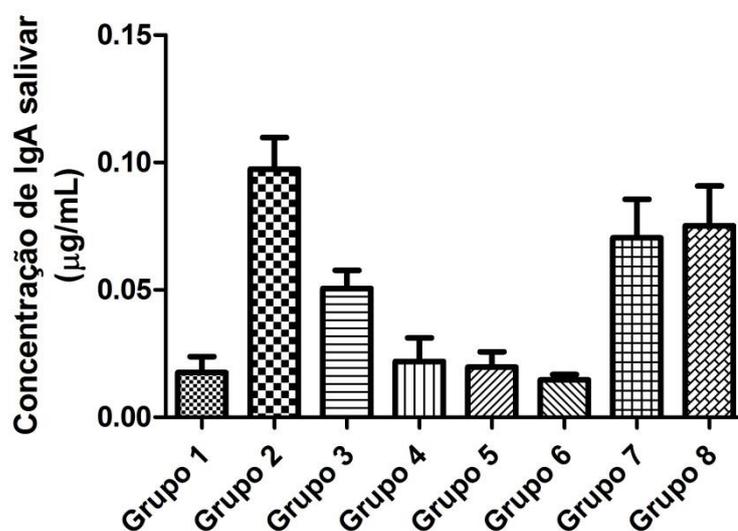


Tabela 22 Análise estatística ANOVA com ferramenta de Bonferroni entre os grupos imunizados, avaliando-se a concentração de anticorpo secretor sIgA total.

Teste múltiplo		
comparativo de	Significante?	
Bonferroni's	P < 0.05?	Resumo
Grupo 1 vs Grupo 2	Sim	***
Grupo 1 vs Grupo 3	Não	ns
Grupo 1 vs Grupo 4	Não	ns
Grupo 1 vs Grupo 5	Não	ns
Grupo 1 vs Grupo 6	Não	ns
Grupo 1 vs Grupo 7	Sim	***
Grupo 1 vs Grupo 8	Sim	***
Grupo 2 vs Grupo 3	Sim	**
Grupo 2 vs Grupo 4	Sim	***
Grupo 2 vs Grupo 5	Sim	***
Grupo 2 vs Grupo 6	Sim	***
Grupo 2 vs Grupo 7	Sim	*
Grupo 2 vs Grupo 8	Não	ns
Grupo 3 vs Grupo 4	Não	ns
Grupo 3 vs Grupo 5	Não	ns
Grupo 3 vs Grupo 6	Não	ns
Grupo 3 vs Grupo 7	Não	ns

Grupo 3 vs Grupo 8	Não	ns
Grupo 4 vs Grupo 5	Não	ns
Grupo 4 vs Grupo 6	Não	ns
Grupo 4 vs Grupo 7	Sim	***
Grupo 4 vs Grupo 8	Sim	***
Grupo 5 vs Grupo 6	Não	ns
Grupo 5 vs Grupo 7	Sim	***
Grupo 5 vs Grupo 8	Sim	***
Grupo 6 vs Grupo 7	Sim	***
Grupo 6 vs Grupo 8	Sim	***
Grupo 7 vs Grupo 8	Não	ns

Pode-se concluir que o modelo vacinal foi efetivo e que o polissacarídeo do GBS sorotipo Ia é um candidato a antígeno vacinal.

Para cada etapa de caracterização da cápsula polissacarídica ficou clara a importância de um bom delineamento experimental para a realização dos ensaios físico-químicos e de caracterização.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que o polissacarídeo do GBS sorotipo IA é um bom candidato a antígeno vacinal. A utilização da proteína OVA foi capaz de melhorar a indução da resposta humoral sistêmica e de mucosas. Houve boa resposta imunológica por *delivery* de mucosa sublingual e por intraperitoneal que serviu como modelo positivo.

A adição do suplemento L-Prolina foi a que propiciou, a princípio, maior relação entre crescimento bacteriano e formação de cápsula polissacarídica. O uso de meio de cultivo (TSB), sem adição de proteínas de origem animal também produziu cápsula polissacarídica e diminui o risco de transmissão de *prions*. O rendimento após purificação e a extração da cápsula foram semelhantes a outros trabalhos realizados nesta área.

A difração de raios-X foi realizada para caracterização e identificação da cristalinidade de PS ou amorfologismo. O padrão de difração de raios X não mostrou nenhum pico característico, o que indica que a estrutura é completamente amorfa. Os resultados mostram que o polissacarídeo isolado apresenta comportamento semelhante a outros isolados polissacarídicos.

A partir da análise por cromatografia gasosa (CGMS), foi calculada a porcentagem de composição do PS produzido. Trata-se de uma Rhamnoglucana bem heterogênea, contendo ramificações de fucose, manose, glicose, galactose e N-acetil-glucosamina. A técnica de NMR caracterizou a estrutura conformacional e confirmou a composição: β -D-glicofuranose, α -L-ramnopirranose, β -D-galactopirranose, β -D-glicopirranose e β -D-N-acetil-glicopiranosamina.

A determinação das propriedades térmicas e físicas T_g , T_{eut} e T_{col} do PS tinha o propósito de aperfeiçoar o processo de liofilização. O processo de liofilização ajuda na estabilidade do produto, trazendo uma nova perspectiva de produção, garantindo maior estabilidade de longo período para posterior acoplamento químico com uma proteína.

A presença de polissacarídeo mostrou bons resultados de encapsulamento, provavelmente pela interação entre o polissacarídeo e a OVA.

A análise de DLS corresponde a outros trabalhos publicados (200 a 400 nm) e o potencial Zeta acima de 20 demonstra boa capacidade mucoadesiva das nanopartículas.

A imunização por nanopartícula de quitosana por via sublingual levou à produção de IgG sérico específico para polissacarídeos e aumento da concentração de IgA total na saliva.

O modelo vacinal foi efetivo e novos estudos na área de tecnologia farmacêutica precisam ser conduzidos para aperfeiçoar e validar cada etapa do processo produtivo.

De acordo com WHO (2017), ainda não existe, atualmente, uma vacina aprovada e registrada para a imunização materna e para a prevenção do GBS. Uma vacina com múltiplos sorotipos de polissacarídeos capsulares conjugados com proteína poderia reduzir o risco de recém-nascidos e lactentes contraírem a doença através da passagem transplacentária de imunoglobulinas protetoras. O problema global de resistência antimicrobiana e a importância da preservação do microbioma neonatal são fatores críticos que precisam ser estimados e que justificariam também prosseguir esforços para o desenvolvimento de uma vacina com potencial para superar a diversidade de sorotipos e a especificidade de proteção.

7 AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

8 SUGESTÃO PARA PESQUISA FUTURA

8.1 Conjugação química do polissacarídeo e proteína imunogênica

Polissacarídeos são cadeias poliméricas, constituídos por longas cadeias de unidades de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas e moléculas de hidratos de carbono. O método de conjugação depende da análise da disponibilidade dos grupos funcionais presentes nos polissacarídeos (hidroxilas ou carboxilas) e nas proteínas (amino, grupo das lisinas e ácido carboxílico dos aminoácidos, ácido aspártico e glutâmico). Para o desenvolvimento de vacinas garantindo-se reprodutibilidade, linearidade e robustez do processo, deve-se desenvolver método válido de conjugação. As principais metodologias de conjugação são: método de brometo de cianogênio, método da carbodiimida, método de aminaçãõ redutiva e oxidação com periodato de sódio. Cada metodologia de conjugação conduz à formação de uma estrutura química final (LORTHIOIS, 2008). O método de conjugação é constituído por: ativação do PS (oxidação e derivatização de periodato) e ativação do proteína. O conjugado é obtido após a ligação covalente entre as moléculas.

A escolha do método de conjugação química para obtenção de vacinas conjugadas também é um passo essencial para o alcance de uma resposta efetiva (LORES, 2016). A indução de memória imunológica em vacinas conjugadas depende de vários fatores, como, por exemplo, comprimento do polissacarídeo, método de conjugação química realizada, dosagem utilizada, parâmetros experimentais e composição antigênica do conjugado, que inclui o polissacarídeo e os carreadores utilizados. Um dos fatores importantes é a habilidade de induzir a resposta imune em uma vacina conjugada dependente da relação proteína/polissacarídeo, que pode ocasionar hiperestimulação do sistema imune ou baixa imunogenicidade. Essa difícil determinação relacional polissacarídeo/proteína normalmente é estabelecida após a condução de diversos experimentos e estudos pré-clínicos, mas espera-se, inicialmente, que se obtenham resultados positivos para posterior otimização do processo.

Como mecanismo de orientação para o desenvolvimento de uma vacina, planejamos o Perfil de Produto Alvo (TPP) – tabela 23 abaixo, que serve como orientação para alcançarmos os requisitos desejados da vacina.

Tabela 23 Planejamento para o desenvolvimento da vacina polissacarídica contra *Streptococcus agalactiae* para gestantes através do “Perfil de produto Alvo” (TPP)

Target Product Profile (TPP) Perfil do Produto alvo	
Indicação	Uso profilático
Indicação de uso	Para imunização ativa de mulheres gestantes para proteção contra a colonização patôgena do EGB no trato urinário genital
Público alvo	Todos os adultos saudáveis, principalmente mulheres grávidas
Segurança / Reactogenicidade	Segurança e reatogenicidade pelo menos comparáveis às vacinas de rotina recomendadas pelo Ministério da Saúde, proporcionando um perfil de risco-benefício altamente favorável, idealmente apenas com eventos adversos transitórios leves relacionados à vacinação e nenhum EA sério relacionado à vacinação
Eficácia	Maior que 70% de eficácia na prevenção de doenças em adultos saudáveis e gestantes
Dose	Séries primárias: Não mais do que 2 doses, não mais que 1 mês de intervalo.
Durabilidade da proteção	Conferir proteção duradoura de 5 anos ou mais após a série primária e pode ser mantida por doses de reforço.
Rota de administração	Mucosa sublingual
Cobertura vacinal	Multi serotipos (cobertura dos 10 serotipos existentes)
Estabilidade do produto e armazenamento	Produto final liofilizado a ser ressuscitado em salina na hora da aplicação Prazo de validade de pelo menos 24 meses a 2-8 ° C e demonstração de pelo menos 6 meses de estabilidade a temperatura ambiente
Co administração com outras vacinas	A vacina será administrada como um produto autônomo não co-administrado com outras vacinas.
Apresentação	A vacina liofilizada deverá ser acompanhada por frascos separados do diluente apropriado
Registro e pre qualificação	Deve ser pré-qualificada pela ANVISA de acordo com o processo descrito na resolução RDC 55/2010

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015.

ABDELWAHED, Wassim *et al.* Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. **Advanced drug delivery reviews**, v. 58, n. 15, p. 1688-1713, 2006.

ABDULACK-LOPES, Fernanda. Resposta imune ao parvovírus canino tipo 2 (CPV 2) em hidrogel de quitosana administrado via sublingual. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ADAMS, Adrienne *et al.* Adherence to the updated guidelines for the prevention of perinatal Group B streptococcal disease. **Proceedings in Obstetrics and Gynecology**, v. 4, n. 3, p. 1-2, 2015.

AGNIHOTRI, Sunil A.; MALLIKARJUNA, Nadagouda N.; AMINABHAVI, Tejraj M. Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery. **Journal of controlled release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.

AHMADZIA, Homa K.; HEINE, R. Phillips. Diagnosis and management of group B streptococcus in pregnancy. **Obstetrics and Gynecology Clinics**, v. 41, n. 4, p. 629-647, 2014.

AIZENSTEIN, Moacyr Luiz. **Fundamentos para o uso racional de medicamentos**. Elsevier Brasil, 2017.

ALBANI, Silvia Maria Ferreira. **Métodos alternativos de purificação do polissacarídeo capsular de Haemophilus influenzae tipo b**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ALI, Mohamed Elsayed Abdelfattah *et al.* Chitosan nanoparticles extracted from shrimp shells, application for removal of Fe (II) and Mn (II) from aqueous phases. **Separation Science and Technology**, p. 1-12, 2018.

ALMEIDA JÚNIOR, João Nobrega de. **Padronização da espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de cepas de Trichosporon spp. de importância médica**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ALÓS CORTÉS, Juan Ignacio *et al.* Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas. Actualización 2012. Documento de consenso SEIMC/SEGO/SEN/SEQ/SEMFYC. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, p. 159-172, 2013.

ALVAREZ CRUZ, Adilys; TORAÑO PERAZA, Gilda; LLANES CABALLERO, Rafael. Colonización vaginal/rectal por Streptococcus agalactiae en gestantes de Melena del Sur, Cuba. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 66, n. 3, p. 415-423, 2014.

AMIDI, Maryam *et al.* Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 59-82, 2010.

ANDRADE, Laura Freitas de. **Vetorização de compostos 5-nitro-heterocíclicos com atividade frente a microrganismos multirresistentes. Obtenção de nanopartículas carregadas e avaliação da atividade antimicrobiana.** 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9135/tde-04072018-123815/>>. Acesso em: 2018-09-10.

ANVISA: BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução RDC nº 55, de 17 de maio de 2005. Registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos biológicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA.

ARDOLINO, Luca Ivan *et al.* Preclinical evaluation of tolerability of a selective, bacteriostatic, locally active vaginal formulation. **Current Therapeutic Research**, v. 83, p. 13-21, 2016.

ARPINI, Clarisse Maximo; **Genes de virulência de *Streptococcus agalactiae* associados à mastite bovina em rebanhos de Minas Gerais.** Universidade Federal de Lavras; UFLA, 2011.

BAKER, Carol J. *et al.* Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B streptococcus. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 18, p. 1180-1185, 1988.

BAKER, Carol J. Group B Streptococcal. **Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis**, p. 222, 2000.

BAKER, Carol J. Immunization Of Pregnant Women With A Polysaccharide Vaccine To Group B Streptococcus. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 8, n. 8, p. 544, 1989.

BAKER, Carol J.; KASPER, Dennis L. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. **New England Journal of Medicine**, v. 294, n. 14, p. 753-756, 1976.

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

BANSAL, Arvind K. Bioinformatics in microbial biotechnology—a mini review. **Microbial cell factories**, v. 4, n. 1, p. 19, 2005.

BERARDI, Alberto; FERRARI, Fabrizio; FACCHINETTI, Fabio. Intrapartum antibiotic prophylaxis for Group B *Streptococcus* and risks of unnecessary antibiotics. *American journal of obstetrics and gynecology*, v. 212, n. 3, p. 408-408, 2015.

BEXIGA, N. M. *et al.* Freeze-drying of ovalbumin-loaded carboxymethyl chitosan nanocapsules: Impact of freezing and annealing procedures on physicochemical properties of the formulation during dried storage. **Drying Technology**, v. 36, n. 4, p. 400-417, 2018.

BORGES, Olga *et al.* Evaluation of the immune response following a short oral vaccination schedule with hepatitis B antigen encapsulated into alginate-coated chitosan nanoparticles. *European journal of pharmaceutical sciences*, v. 32, n. 4, p. 278-290, 2007.

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

BRANDTZAEG, Per. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine*, v. 25, n. 30, p. 5467-5484, 2007.

BRANDTZAEG, Per. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *The Journal of pediatrics*, v. 156, n. 2, p. S8-S15, 2010.

BRASIL Sistema Único de Saúde. PORTARIA Nº 2.531, DE 12 DE NOVEMBRO DE 2014.

BRICKS, Lucia F. Vacina antipneumocócica: eficácia em diferentes grupos de risco e recentes avanços no desenvolvimento de uma vacina mais imunogênica: atualização. *J Pediatr (Rio J)*, v. 70, p. 75-81, 1994.

BRODIN, Petter; DAVIS, Mark M. Human immune system variation. *Nature reviews immunology*, v. 17, n. 1, p. 21, 2017.

BUNDLE, David R.; GERKEN, Manfred; PERRY, Malcolm B. Two-dimensional nuclear magnetic resonance at 500 MHz: the structural elucidation of a Salmonella serogroup N polysaccharide antigen. *Canadian journal of chemistry*, v. 64, n. 2, p. 255-264, 1986.

CAIAFFA FILHO, Hélio Hehl; MENDES, Caio Márcio Figueiredo. Novo método para a rápida identificação presuntiva dos estreptococos beta-hemolíticos do Grupo B (*Streptococcus agalactiae*). *Rev. bras. patol. clín.*, v. 22, n. 2, p. 43-6, 1986.

CALAM, D. *et al.* **Review of recommendations and guidelines for biological substances used in medicine and other documents.** Geneva: World Health Organization, 2004.

CASTELLANO FILHO, Didier Silveira; TIBIRIÇÁ, Sandra Helena Cerrato; DINIZ, Cláudio Galuppo. Doença Perinatal associada aos estreptococos do Grupo B: aspectos clínico-microbiológicos e prevenção. *HU Revista*, v. 34, n. 2, 2008.

CHACÓN, M. *et al.* Stability and freeze-drying of cyclosporine loaded poly (d, l lactide-glycolide) carriers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 8, n. 2, p. 99-107, 1999.

CHAPLIN, David D. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2, p. S3-S23, 2010.

CHUA, Wei-Jen; HANSEN, Ted H. Immunology: vitamins prime immunity. *Nature*, v. 491, n. 7426, p. 680, 2012.

COSTA, Helenilce de Paula Fiod; BRITO, A. S. Prevenção da doença perinatal pelo estreptococo do grupo B. *Manual da Sociedade Brasileira de Pediatria*, p. 1-18, 2011.

COSTANTINO, Paolo; RAPPUOLI, Rino; BERTI, Francesco. The design of semi-synthetic and synthetic glycoconjugate vaccines. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 6, n. 10, p. 1045-1066, 2011.

- CSABA, Noemi; KÖPING-HÖGGÅRD, Magnus; ALONSO, Maria Jose. Ionically crosslinked chitosan/tripolyphosphate nanoparticles for oligonucleotide and plasmid DNA delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 382, n. 1-2, p. 205-214, 2009.
- ÇUBURU, Nicolas *et al.* Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 51, p. 8598-8610, 2007.
- DANCHIN, Antoine; FANG, Gang; NORIA, Stanislas. The extant core bacterial proteome is an archive of the origin of life. **Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 875-889, 2007.
- DESAI, Manisha P. *et al.* The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 11, p. 1568-1573, 1997.
- DIETRICH, Guido *et al.* Experience with registered mucosal vaccines. **Vaccine**, v. 21, n. 7-8, p. 678-683, 2003.
- DÍEZ-DOMINGO, Javier *et al.* A randomized, multicenter, open-label clinical trial to assess the immunogenicity of a meningococcal C vaccine booster dose administered to children aged 14 to 18 months. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 29, n. 2, p. 148-152, 2010.
- DISCHE, Zacharias; SHETTLES, Landrum B. A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 175, n. 2, p. 595-603, 1948.
- DOGAN, N. M. *et al.* Characterization of extracellular polysaccharides (EPS) produced by thermal bacillus and determination of environmental conditions affecting exopolysaccharide production. **International Journal of Environmental Research**, v. 9, n. 3, p. 1107-1116, 2015.
- DUBOIS, Michel *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.
- DUTRA, Vanusa G. *et al.* Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 323, 2014.
- EMANEINI, Mohammad *et al.* High incidence of macrolide and tetracycline resistance among Streptococcus agalactiae strains isolated from clinical samples in Tehran, Iran. **Maedica**, v. 9, n. 2, p. 157, 2014.
- FARLEY, Monica M. *et al.* A population-based assessment of invasive disease due to group B Streptococcus in nonpregnant adults. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 25, p. 1807-1811, 1993.
- FIOLO, Katelí *et al.* Identificação dos sorotipos de Streptococcus agalactiae pela técnica de PCR de amostras isoladas em pacientes colonizados e infectados na cidade de Campinas e região. 2011.
- FIOLO, Kateli *et al.* Infection rate and Streptococcus agalactiae serotypes in samples of infected neonates in the city of Campinas (São Paulo), Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 34, n. 12, p. 544-549, 2012.

FIOLO, Kateli *et al.* Taxa de infecção e sorotipos de *Streptococcus agalactiae* em amostras de recém-nascidos infectados na cidade de Campinas (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 2012.

FIorentino, Flávia Angélica Másquio. Desenvolvimento e controle de qualidade de formulação cosmética contendo Digluconato de Clorexidina. 2009.

FORD, Andrew Q. *et al.* Global Vaccine and Immunization Research Forum: Opportunities and challenges in vaccine discovery, development, and delivery. **Vaccine**, v. 34, n. 13, p. 1489-1495, 2016.

GAN, Quan; WANG, Tao. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier—systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, n. 1, p. 24-34, 2007.

GANOR-PAZ, Yael *et al.* Obstetric and neonatal outcomes after preterm premature rupture of membranes among women carrying group B streptococcus. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 129, n. 1, p. 13-16, 2015.

GERAGHTY, R. J. *et al.* Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. **British journal of cancer**, v. 111, n. 6, p. 1021, 2014.

HALPERIN, Scott A. *et al.* 1335 Transfer and Persistence of Antibodies in Infants Following Maternal Immunization with an Investigational Trivalent Group B Streptococcus Vaccine. In: **Open Forum Infectious Diseases**. Oxford University Press, 2014. p. S56-S57.

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

HENRIQUES, A. W. S. *et al.* Capsular polysaccharide production by *Neisseria meningitidis* serogroup C: Optimization of process variables using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1822-1828, 2006.

HERMANSON, Greg T. **Bioconjugate techniques**. Academic press, 2013.

HEYDERMAN, Robert S. *et al.* Group B streptococcus vaccination in pregnant women with or without HIV in Africa: a non-randomised phase 2, open-label, multicentre trial. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 5, p. 546-555, 2016.

HIGH, Kevin P.; EDWARDS, Morven S.; BAKER, Carol J. Group B streptococcal infections in elderly adults. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 6, p. 839-847, 2005.

HOLMGREN, Jan; CZERKINSKY, Cecil. Mucosal immunity and vaccines. **Nature medicine**, v. 11, n. 4s, p. S45, 2005.

JANS, Christoph; BOLEIJ, Annemarie. The road to infection: Host-microbe interactions defining the pathogenicity of *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex members. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 603, 2018.

JOHRI, Atul Kumar *et al.* Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 932, 2006.

JÓNSDÓTTIR, I. Maturation of mucosal immune responses and influence of maternal antibodies. **Journal of comparative pathology**, v. 137, p. S20-S26, 2007.

KIRCHER, Henry W. Gas-liquid partition chromatography of methylated sugars. *Analytical Chemistry*, v. 32, n. 9, p. 1103-1106, 1960.

KJER-NIELSEN, Lars *et al.* MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. **Nature**, v. 491, n. 7426, p. 717, 2012.

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

KOGAN, Grigorij *et al.* Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B Streptococcus capsular polysaccharide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 15, p. 8786-8790, 1996.

KONG, Lingshan *et al.* Physicochemical characterization of the polysaccharide from *Bletilla striata*: Effect of drying method. **Carbohydrate polymers**, v. 125, p. 1-8, 2015.

KRAEHENBUHL, Jean-Pierre; R NEUTRA, Marian. Mucosal vaccines: where do we stand?. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 13, n. 20, p. 2609-2628, 2013.

KWEON, Mi-Na. Sublingual mucosa: A new vaccination route for systemic and mucosal immunity. **Cytokine**, v. 54, n. 1, p. 1-5, 2011.

LANCEFIELD, Rebecca C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **Journal of experimental medicine**, v. 57, n. 4, p. 571-595, 1933.

LASKAR, K.; RAUF, A. Chitosan Based Nanoparticles towards Biomedical Applications. **J Nanomed Res**, v. 5, n. 2, p. 00112, 2017.

LEBIEN, Tucker W.; TEDDER, Thomas F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1570-1580, 2008.

LEINIKKI, Pauli O.; PASSILA, Suvi. Quantitative, semiautomated, enzyme-linked immunosorbent assay for viral antibodies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 136, n. Supplement_2, p. S294-S299, 1977.

LIÉBANA-MARTOS, María del Carmen *et al.* Serotipos y patrones de resistencia antibiótica en aislados beta-hemolíticos de *Streptococcus agalactiae* de madres colonizadas y recién nacidos con enfermedad invasiva. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 2, p. 84-88, 2015.

LORES, Lazara Elena Santiesteban. **Síntese, caracterização e avaliação imunológica de conjugados do sorotipo 6B de *Streptococcus pneumoniae* à proteína A de superfície pneumocócica (PspA)**. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

LORTHIOIS, Ana Paula de Almeida Aranha. **Desenvolvimento de processo para obtenção do método de conjugação do polissacarídeo capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b com toxóide tetânico**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MACHA, CHANDRASHEKAR; LAVANYA, A.; NANNA, R. Purification of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides using aluminium phosphate and

ethanol. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 664-670, 2014.

MADHI, Shabir 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, 2013.

MALEK-JAFARIAN, Masoumeh; HOSSEINI, Fatemeh-Sadat; AHMADI, Abodol-Reza. Pattern of infection and antibiotic activity among Streptococcus agalactiae isolates from adults in Mashhad, Iran. **Reports of biochemistry & molecular biology**, v. 3, n. 2, p. 89, 2015.

MATHEW, J. L. Effect of maternal antibiotics on breast feeding infants. **Postgraduate medical journal**, v. 80, n. 942, p. 196-200, 2004.

MATSUDA, Brent *et al.* Group B streptococcal (GBS) Bacteremia with Mycotic Thoracic Aortic Aneurysm and Suppurative Pericardial Effusion. **Hawai'i Journal of Medicine & Public Health**, v. 73, n. 9 Suppl 1, p. 25, 2014.

MCCLUSKIE, Michael J.; DAVIS, Heather L. Mucosal immunization with DNA vaccines. **Microbes and infection**, v. 1, n. 9, p. 685-698, 1999.

MERCER, Brian M.; BRIGGS, Rodney G. Group B streptococcus and pregnancy. **Pediatric annals**, v. 25, n. 4, p. 206-214, 1996.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo *et al.* Sistema imunitário-parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2010.

MOROZUMI, Miyuki *et al.* Direct identification of Streptococcus agalactiae and capsular type by real-time PCR in vaginal swabs from pregnant women. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 21, n. 1, p. 34-38, 2015.

MORRIS, Gordon A. *et al.* The effect of prolonged storage at different temperatures on the particle size distribution of tripolyphosphate (TPP)-chitosan nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v. 84, n. 4, p. 1430-1434, 2011.

NUCCITELLI, Annalisa; RINAUDO, C. Daniela; MAIONE, Domenico. Group B Streptococcus vaccine: state of the art. **Therapeutic advances in vaccines**, v. 3, n. 3, p. 76-90, 2015.

OIEN, Nancee L. *et al.* Induction of local and systemic immunity against human respiratory syncytial virus using a chimeric FG glycoprotein and cholera toxin B subunit. **Vaccine**, v. 12, n. 8, p. 731-735, 1994.

OYANGUREN, B. *et al.* Central nervous system involvement in adult patients with invasive infection caused by Streptococcus agalactiae. **Neurología (English Edition)**, v. 30, n. 3, p. 158-162, 2015.

PATO, Tânia Pinheiro; ANTONIO DE PÁDUA, R. Barbosa; DA SILVA JUNIOR, José Godinho. Purification of capsular polysaccharide from Neisseria meningitidis serogroup C by liquid chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 832, n. 2, p. 262-267, 2006.

- PEI, Fang Xin; KIM, Sang Moo. Physicochemical and Biological Characteristics of Squid β -Chitosan Nanoparticle. **International Journal of Food Engineering**, v. 3, n. 1, 2017.
- PELLEGRINO, Paolo; CLEMENTI, Emilio; RADICE, Sonia. On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives. **Autoimmunity reviews**, v. 14, n. 10, p. 880-888, 2015.
- POLLARD, Andrew J.; PERRETT, Kirsten P.; BEVERLEY, Peter C. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 3, p. 213, 2009.
- PRABAHARAN, Mani. Chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. **Journal of biomaterials applications**, v. 23, n. 1, p. 5-36, 2008.
- PRATELLI, Annamaria *et al.* Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 3, p. 612-615, 2001.
- RASKOVIĆ, Predrag. Step-by-step process integration method for the improvements and optimization of sodium tripolyphosphate process plant. **Energy**, v. 32, n. 6, p. 983-998, 2007.
- RASMUSSEN, Sonja A. *et al.* Vaccines and pregnancy: past, present, and future. In: **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**. Elsevier, 2014. p. 161-169.
- RAVENSCROFT, Neil *et al.* Genetic and structural elucidation of capsular polysaccharides from *Streptococcus pneumoniae* serotype 23A and 23B, and comparison to serotype 23F. **Carbohydrate research**, v. 450, p. 19-29, 2017.
- ROSSI-BERGMANN, Bartira. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.
- SALDAÑA GONZALES, Richard. **Resposta imune do antígeno de superfície de hepatite B administrado via nasal em nanopartículas de quitosana liofilizadas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SANTAMARIA, Raquel. **Desenvolvimento e avaliação da resposta imune humoral de uma vacina anti-pneumocócica conjugada: polissacarídeo capsular sorotipo 14-proteína de superfície pneumocócica A**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- SANTOS, Gustavo RC *et al.* Exploring the structure of fucosylated chondroitin sulfate through bottom-up nuclear magnetic resonance and electrospray ionization-high-resolution mass spectrometry approaches. **Glycobiology**, v. 27, n. 7, p. 625-634, 2017.
- SCASSO, Santiago *et al.* Vaginal group B streptococcus status during intrapartum antibiotic prophylaxis. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 129, n. 1, p. 9-12, 2015.
- SCHAECHTER, Moselio *et al.* Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 2002.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende *et al.* . Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 726-737, Oct. 2003.

SHIN, Jinho et al. WHO informal consultation on the application of molecular methods to assure the quality, safety and efficacy of vaccines, Geneva, Switzerland, 7–8 April 2005. **Biologicals**, v. 35, n. 1, p. 63-71, 2007.

SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE MORTALIDADE – SIM, Tabela de “Óbitos p/Ocorrênc por Capítulo CID-10 segundo Região/Unidade da Federação, Capítulo CID-10: XVI. Algumas afec originadas no período perinatal, Faixa etária 1: 0 a 6 dias, Período: 2014 e 2016 Região/Unidade da Federação Cap XVI Total”, Fonte: MS/SVS/CGIAE - <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/inf10uf.def>

SPEZIALE, Pietro; PIETROCOLA, Giampiero; VISAI, Livia. **Antibodies to the FbsA protein of streptococcus agalactiae and their use in treating or preventing infections**. U.S. Patent Application n. 10/897,429, 15 set. 2005.

STAATS, Herman F. *et al.* Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. **Current opinion in immunology**, v. 6, n. 4, p. 572-583, 1994.

STEPHANO, Marco Antonio. **Veneno de Bothrops jararaca modificado com mPEG (monometoxipolietileno glicol) para elaboração de um adjuvante complexado à partícula antigênica**. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SUMATHI, S.; RAY, Alok R. Release behaviour of drugs from tamarind seed polysaccharide tablets. **J Pharm Pharm Sci**, v. 5, n. 1, p. 12-18, 2002.

TAKAGI, Mickie et al. Purification of capsular polysaccharide produced by Haemophilus influenzae type b through a simple, efficient and suitable method for scale-up. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1217-1222, 2008.

TANIZAKI, Martha M. *et al.* Purification of meningococcal group C polysaccharide by a procedure suitable for scale-up. **Journal of microbiological methods**, v. 27, n. 1, p. 19-23, 1996.

TONIOLO, Chiara *et al.* *Streptococcus agalactiae* capsule polymer length and attachment is determined by the proteins CpsABCD. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. M114. 631499, 2015.

TORCHILIN, Vladimir P. Multifunctional pharmaceutical nanocarriers: promises and problems. **Nanotechnologies for the Life Sciences**, 2012.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. Microbiologia. In: **Microbiologia**. 2005.

TSAI, Min-Lang *et al.* The storage stability of chitosan/tripolyphosphate nanoparticles in a phosphate buffer. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 756-761, 2011.

TUASIKAL, B. J. *et al.* Bacterial protein characterization of Streptococcus agalactiae by SDS-PAGE method for subclinical mastitis irradiated vaccine materials in dairy cattle. **Atom Indonesia**, v. 38, n. 2, p. 66-70, 2013.

TURVEY, Stuart E.; BROIDE, David H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. S24-S32, 2010.

UNICEF, Resolution *et al.* United Nations Children's Fund. Situação Mundial da Infância, 2013.

VAN DER LUBBEN, I. M. *et al.* Chitosan for mucosal vaccination. **Advanced drug delivery reviews**, v. 52, n. 2, p. 139-144, 2001.

WHEELER, A. W.; SHARIF, S. Sublingual delivery of vaccines: Can we enhance the immune response induced via this route?. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. S39, 1996.

WHO ANNEX, W. H. O. 2. WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories. **WHO Technical Report Series**, v. 961, p. 2011, 2.

WHO EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION. MEETING; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Expert Committee on Biological Standardization: Sixtieth Report**. World Health Organization, 2013.

XIA, Yufei *et al.* Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the ocean. **Vaccine**, v. 33, n. 44, p. 5997-6010, 2015.

YANG, Chin-Yo; HSU, Chu-Hsi; TSAI, Min-Lang. Effect of crosslinked condition on characteristics of chitosan/tripolyphosphate/genipin beads and their application in the selective adsorption of phytic acid from soybean whey. **Carbohydrate polymers**, v. 86, n. 2, p. 659-665, 2011.

YOSHIDA, Jony Takao. Nanopartículas de quitosana como veículo de vacinação contra a hepatite B via nasal. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ZAMAN, K. *et al.* Effectiveness of maternal influenza immunization in mothers and infants. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 15, p. 1555-1564, 2008.

ZANARDO, Rafaela Tais. **Purificação do polissacarídeo capsular de *Streptococcus pneumoniae* de sorotipo 14**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ZHETYEVA, Yenlik *et al.* Safety of meningococcal polysaccharide-protein conjugate vaccine in pregnancy: a review of the Vaccine Adverse Event Reporting System. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 208, n. 6, p. 478. e1-478. e6, 2013.

10 ANEXOS DIVERSOS:

10.1 PAE – Estágio Supervisionado em Docência

De 1.º agosto de 2015 a 10 de dezembro de 2015

Disciplina: FBT0536 Supervisão e Garantia de Qualidade

Prof. Dr. Responsável: Dr. Marco Antônio Stephano

O Estágio Supervisionado em Docência caracterizou-se por participação nas aulas, em seminários, estudos dirigidos e discussão de tópicos em pequenos grupos, bem como organização e participação em plantões para elucidar dúvidas e aplicação de provas.

10.2 Participação como membro do CEP (Conselho de Ética em Pesquisa)

- 1) Participação no 13.º Fórum de Ética em Pesquisa Clínica, realizado no dia 17 de agosto 2015, das 8:00 às 18:00 horas, no IEP Hospital Sírio-Libanês.
- 2) Participação do IV Simpósio de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, realizado no dia 10 de novembro de 2015, das 08:30 às 15:00 horas, no anfiteatro Augusto de Escragnolle Taunay, Av. Dr. Arnaldo, 355 – Cerqueira César – SP, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, com carga horária total de 7 horas.

10.3 Participação como organizadora e palestrante no II Curso de Inverno FBT/FCF/USP e do III Curso de Inverno FBT/FCF/USP

Organização, planejamento e implementação dos convites para palestras e mesa-redonda para o II Curso de Inverno FBT/FCF USP.

II Curso de Inverno na FCF USP – Tema: “Atualidade do Brasil: patentes, inovação e transferência de tecnologia”.

Convidados: Bionovis, Orygen, USP Inovação, CIETEC, Academia Nacional de Farmácia, Alunos de Mestrado, Alunos de Doutorado, Natura, Thomson Reuters, Anvisa, Axonal Consultoria, Superlab, Synbio Brasil, ABDI, Garagem Fab-Lab.

Participou também como palestrante do II Curso de Inverno, com os temas: “Desenvolvimento de vacinas” e “Biorregulamentação de produtos biológicos”.

10.4 Participação em Congressos (Pôster)

XX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia (FCF/USP), com título: “Using Kyoto encyclopedia of genes and genomes (Kegg) database resource to understand the metabolic flux of *Streptococcus agalactiae*”. Autores: Sibylle Sophie Hacker (pg), Paola Araujo e Marco Antonio Stephano (orientador).

Congresso Farmacêutico de São Paulo, de 10 a 13 de outubro de 2015, CRF-SP – Conselho Regional de Farmácia, apresentação de pôster. Título: “*Streptococcus agalactiae* – culture and bacterial metabolismus”.

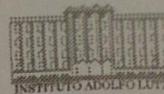
Congresso Farmacêutico de São Paulo, de 10 a 13 de outubro de 2015, CRF-SP – Conselho Regional de Farmácia, apresentação de pôster. Título: “Integration model of e-commerce for organizational strategies”.

II Curso de Inverno em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, realizado nos dias 27 a 31 de julho de 2015, apresentação de pôsteres. Título: “*Streptococcus agalactiae* – culture and bacterial metabolismus”.

10.5 ADOLFO LUTZ – Aquisição de cepa de *Streptococcus agalactiae*



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CENTRO DE PROCEDIMENTOS INTERDISCIPLINARES
NÚCLEO DE COLEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS



Filiada à World Federation of Culture Collections (WFCC) – n° 282
Coleção Fiel Depositária – n° 017/09-SECEX/CGEN/MMA

PREZADO CLIENTE,

Em acordo com nosso Sistema de Gestão da Qualidade do Instituto Adolfo Lutz, solicitamos que seja assinalado abaixo o motivo da sua solicitação de compra .

() Sua solicitação é para validação de testes de ensaios pelo INMETRO.

() Sua solicitação é para controle de qualidade interna .

(X) outros : Resquisa e desenvolvimento

de VACINA POLISSACARÍDEA

*Se a opção for "outros" por favor especificar.

* Este documento deve ser enviado juntamente com a Solicitação e Declaração de Uso das Linhagens.

Att,

Dra. Tânia Sueli de Andrade
Diretora Técnica – Núcleo de Coleção de Micro-organismos IAL

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Depto. Tec. Bioquímico - Farmacêutica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

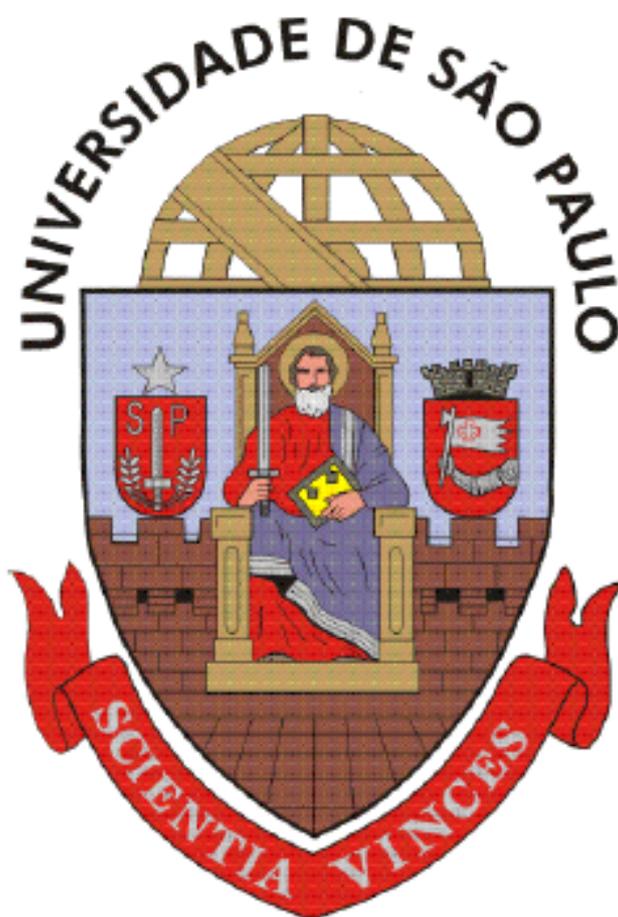
Av. Doutor Arnaldo, n°351 – 10° Andar – Cerqueira César
São Paulo/SP – CEP: 01246-902 – Tel: (11) 3068-2884
colecacaoial@ial.sp.gov.br

1/1

11 ANEXO: FICHA DO ALUNO

13/09/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 21247742 - Sibylle Sophie Hacker

Email: sibylle@usp.br

Data de Nascimento: 20/11/1971

Cédula de Identidade: RG - 20.884.798 - SP

Local de Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Bacharel em Administração - Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 1994

Graduação: Químico Industrial - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2003

Mestrado: Mestre em Administração - Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2003

Curso:	Doutorado
Programa:	Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área:	Tecnologia de Fermentações

13/09/2018

Data de Matrícula: 25/08/2014

Início da Contagem de Prazo: 25/08/2014

Data Limite para o Depósito: 24/09/2018

Orientador: Prof(a). Dr(a). Marco Antonio Stephano - 25/08/2014 até o presente. Email: stephano@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 25/08/2014

Prorrogação(ões): 30 dias
Período de 25/08/2018 até 24/09/2018

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 04/10/2016

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

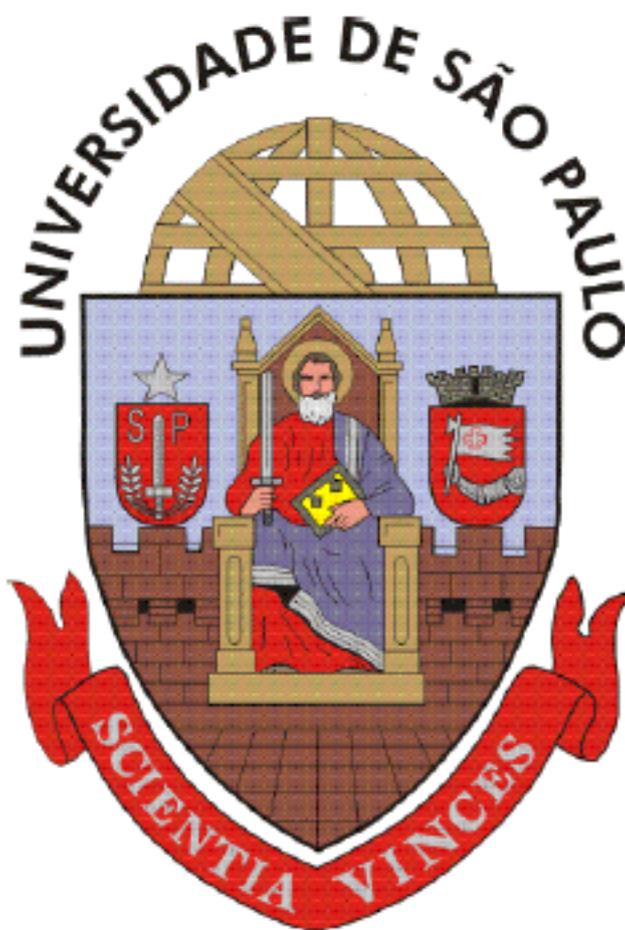
Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 25/08/2014
Prorrogação em 15/08/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 15/08/2018

Impresso em: 13/09/2018 21:58:54



Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9134 - 2124774/2 - Sibylle Sophie Hacker

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5706-3/1	Estratégias e Gerenciamentos de Processos Farmacêuticos e Biotecnológicos (1)	10/03/2014	11/05/2014	45	3	100	A	N	Concluída
PSC5964-1/1	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	30/09/2014	10/11/2014	30	2	100	A	N	Concluída
TNA5801-1/3	Purificação de Proteínas e Peptídeos (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	23/02/2015	05/04/2015	120	0	-	-	N	Turma cancelada

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
TNA5773-4/1	Gestão do Conhecimento - Transformando Dados em Conhecimento (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	23/02/2015	03/05/2015	150	10	100	A	N	Concluída
BMM5833-3/2	Análise Crítica da Participação de Bactérias Anaeróbias em Processos Infeciosos de Humanos e de Animais (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	05/03/2015	15/04/2015	60	4	100	B	N	Concluída
BMM5747-7/3	Bioquímica Bacteriana (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	01/04/2015	02/06/2015	90	6	100	C	N	Concluída
FBT5700-3/2	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	08/05/2015	09/07/2015	90	6	100	B	N	Concluída
FBF5819-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Tecnologia Analítica de Processo - PAT e Qualidade por Design - QbD)	22/06/2015	30/06/2015	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5822-1/1	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Calorimetria e Termodinâmica no Desenho de Novos Fármacos)	02/09/2015	08/09/2015	30	2	100	A	N	Concluída
TNA5796-1/4	Métodos de Modelagem e de Pesquisa Quantitativa (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	09/09/2015	01/12/2015	120	8	93	B	N	Concluída
TNM5811-3/2	Técnicas de Caracterização Física e Química de Materiais (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	10/09/2015	18/11/2015	150	10	100	B	N	Concluída
FBT5773-7/7	Tópicos Especiais em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica	07/03/2016	15/05/2016	30	2	100	A	N	Concluída
TNA5801-1/6	Purificação de Proteínas e Peptídeos (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	30/05/2016	10/07/2016	120	8	92	A	N	Concluída

13/09/2018

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5905-1/1	Planejamento Experimental e Análise Multivariada	13/02/2017	26/02/2017	60	4	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	67
Estágios:			
Total:	0	20	67

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 15/08/2018

Impresso em: 13/09/2018 21:58:54

12 ANEXO: CURRICULUM LATTES

19/09/2018

Currículo Lattes



Imprimir
currículo



Sibylle Sophie Hacker

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1304914189289425>

Última atualização do currículo em 05/03/2018

Resumo informado pelo autor

Graduada em Química Industrial e Administração de Empresas - USP/SP (1994) mestrado em Administração com ênfase em Marketing/ Tecnologia da Informação pela Universidade de São Paulo (2005). Tem como linha de pesquisa atualmente a) desenvolvimento de tecnologia farmacêutica e processos vacinas (upstream e downstream); b) validação de processos biotecnológicos e de controle de qualidade de produtos biológicos; c) estudos sobre adjuvantes e sistemas de fornecimento (delivery) para vacinas d) desenvolvimento de produtos e análise do potencial mercadológico.
(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Sibylle Sophie Hacker

Dados pessoais

Nascimento 20/11/1971 - São Paulo/SP - Brasil

CPF 157.817.858-45

Formação acadêmica/titulação

- 2014** Doutorado em Biotecnologia.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Este trabalho busca estudar a eficácia de uma vacina de proteína conjugada com polisacarídeo de *Streptococcus agalactiae* do grupo B para a prevenção desta infecção em gestantes e na mortalidade de neonatos.
Orientador: Marco Antonio Stephano
- 2001** Mestrado em Administração.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Modelo de adoção do comércio eletrônico aos processos organizacionais
Orientador: Hiroo Takaoka
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1999 - 2002** Graduação em Química Industrial.
Faculdades Oswaldo Cruz, FOC, Sao Paulo, Brasil
- 1991 - 1994** Graduação em Administração.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Marketing de Serviço
Orientador: Professor Joel Souza Dutra
- 1995 - 1995** Aperfeiçoamento em Administração.
Goethe Universität Frankfurt am Main, UNI-FRANKFURT, Frankfurt, Alemanha

Formação complementar

- 2018 - 2018** Curso de curta duração em Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie. (Carga horária: 80h).
Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, WWU, Alemanha

Atuação profissional

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP - FCF USP

Vínculo
institucional

2014 - Atual

2. Loma Chemie Marketing e Consultoria Ltda - LOMA CHEMIE

Vínculo
institucional

2010 - 2014 Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: sócia consultora, Regime: Parcial

3. Optika Mundo Visão - MUNDO VISÃO

Vínculo
institucional

2007 - 2009 Vínculo: consultor , Enquadramento funcional: consultora, Regime: Parcial

4. Centro Universitário FECAP - FECAP

Vínculo
institucional**2001 - 2011** Vínculo: Celetista formal , Enquadramento funcional: professora assistente, Regime: Parcial

5. Wolf Hacker Cia Ltda - WH

Vínculo
institucional**1991 - 2006** Vínculo: Outro , Enquadramento funcional: Outro (especifique) , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

01/1991 - 12/2000 Direção e AdministraçãoCargos ocupados:
Administrador geral

Membro de comitê de assessoramento

1. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Vínculo

2015 - Atual Regime: Parcial

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.  HACKER, Sibylle Sophie; OLIVEIRA, Tânia M Veludo de; ALVES, Flávia Helena Dante
O enfoque estratégico na gestão da cadeia de suprimentos: análise e aplicação de aspectos conceituais no caso Gradina. Associação Nacional dos Programas de Pós Graduação Em Administração. . p.259 - 260, 2002.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. HACKER, Sibylle Sophie
III Curso de Inverno em Tecnologia Bioquímico Farmacêutico FCF USP. 2017, 2017. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
2. HACKER, Sibylle Sophie; UONO, M. T.
Regulamentação em bioproductos: tendências e regulamentação em engenharia farmacêutica, 2017. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
3. HACKER, Sibylle Sophie
Vacinas: tendências e desafios de regulamentação, 2017. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
4. HACKER, Sibylle Sophie
Desenvolvimento de vacinas, 2015. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
5. HACKER, Sibylle Sophie
Marketing de serviço, 2010. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)
6. HACKER, Sibylle Sophie
Marketing: conceitos e estudos de caso, 2002. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 19/09/2018 às 21:03:35.

13 ANEXO: CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 9.2017-P536

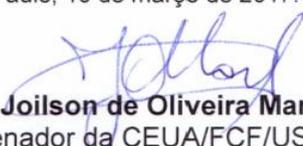
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Imunização via mucosa contra *Streptococcus Agalactiae* do grupo B com nanopartícula de quitosana**, registrada com o nº **536**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Sibylle Sophie Hacker**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. Marco Antonio Stephano** – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **10 de março de 2017**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/03/2017 a 31/08/2018
Espécie/linhagem/raça	Mus musculus / Balb/c
Número de animais	48
Peso/Idade	20g; 4 semanas
Sexo	Fêmea
Origem	Biotério - USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 10 de março de 2017.


Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP