

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***Caracterización de la respuesta inmune celular inducida por un prototipo de vacuna oral contra Streptococcus agalactiae en modelo murino***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Proteínas Recombinantes y Biotecnología y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

***CARLOS FELIPE HERNÁNDEZ ASTUDILLO***

**Director de Tesis: Dr. Christian A. M. Wilson Moya , Dr. Abel E. Vázquez Veloso y Dr. Alexis Kalergis**

**Santiago-CHILE**

**JUNIO 2020**

*Dedicada a Dios y a mi Familia.*

## **Agradecimientos**

Agradezco a mi esposa, Araceli Esparza quien me dio el apoyo incondicional durante todo el proceso de la tesis y fue mi pilar fundamental en la culminación de mi formación.

También a mis Padres quienes me apoyaron durante toda mi formación académica y me permitieron desarrollar mis habilidades de las que hago fruto hoy.

A mi Hermana, por siempre tener una palabra de animo cuando estaba agotado y siempre creer en mi.

Agradezco a todos aquellos que durante mi tiempo en Santiago me alojaron en su hogar para que pudiera culminar mis estudios.

Al Dr. Abel Vázquez por aceptarme como tesista, entregarme el conocimiento, guiarme en este proceso y por sus consejos. Agradezco también a todo el equipo de la Sección de Biotecnología del Instituto de Salud Pública, Diego Diaz Dinamarca, Daniel Escobar, Daniel Soto, Ricardo Manzo y América Abarca.

Por sobre todo Agradezco a Dios el permitirme vivir esta experiencia y otorgarme la capacidad de sobrellevar este trabajo y la resiliencia de superar los problemas

A toda mi Familia y amigos que por siempre apoyarme y creer en mi.

## **Publicaciones en revistas científicas**

Los resultados de esta tesis dieron origen a la siguiente publicación:

Diaz-Dinamarca, D.A\*.; Hernandez, C\*.; Escobar, D.F.; Soto, D.A.; Muñoz, G.A.; Badilla, J.F.; Manzo, R.A.; Carrión, F.; Kalergis, A.M.; Vasquez, A.E. Mucosal Vaccination with *Lactococcus lactis*-Secreting Surface Immunological Protein Induces Humoral and Cellular Immune Protection against Group B *Streptococcus* in a Murine Model. *Vaccines* 2020, 8, 146. \* equal contribution

### Otras Publicaciones

Daniel F. Escobar, Diego A. Diaz-Dinamarca, Carlos F. Hernández, Daniel A. Soto, Ricardo A. Manzo, Pedro I. Alarcón, Camila H. Pinto, Diego N. Bastias, Carolayn N. Oberg-Bravo, Robert Rojas, Sebastián E. Illanes, Alexis M. Kalergis & Abel E. Vasquez. Development and analytical validation of real-time PCR for the detection of *Streptococcus agalactiae* in pregnant women. *BMC Pregnancy and Childbirth* 20, 352 (2020)

## **Financiamiento**

Esta tesis fue desarrollada en la Sección de Biotecnología del Departamento de Salud Ambiental del Instituto de Salud Pública de Chile. Contó con el financiamiento del propio del Instituto de Salud Pública de Chile, el Instituto Milenio de Inmunología e Inmunoterapia y de la Beca de CONICYT para realización de Magíster en Chile folio n°22190189.

# Índice general

Publicaciones en revistas científicas.	I
Financiamiento.	II
Índice general.	III
Índice de Figuras y Tablas.	VII
Abreviaturas.	IX
Summary.	XI
Resumen.	XIII
Introducción.	1
1. Métodos profilácticos para la infección de SGB.	3
2. Proteína Inmunogénica de Superficie.	6
3. Vacunas Orales.	7
4. Prototipo de vacuna basada en la Proteína Inmunogénica de Superficie.	9
Hipótesis.	12
Objetivo General.	12
Objetivos Específicos.	12
Materiales y Métodos.	13
1 Obtención de la Proteína SIP a partir de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	13
1.1 Obtención de <i>E. coli</i> BL21(DE3) que exprese la Proteína SIP.	13
1.2 Purificación de la Proteína SIP en <i>E. coli</i> BL21(DE3).	14

<b>2 Evaluación del efecto biológico de la inmunización con <i>L. lactis</i> que secreta SIP.</b>	<b>15</b>
2.1 Preparación de <i>L. lactis</i> para la inmunización.	15
2.2 Preparación de <i>Streptococcus agalactiae</i> para colonización intravaginal.	15
2.3 Modelo de Inmunización y colonización.	16
2.4 Determinación de Unidades formadoras de colonias de SGB.	17
<b>3 Caracterización de la respuesta inmune de r<i>L.lactis</i>-SIP.</b>	<b>17</b>
3.1 Modelo de inmunización y toma de muestra.	17
3.2 Obtención del Suero de los ratones inmunizados con r <i>L.lactis</i> -SIP.	18
3.3 Obtención del lavado intestinal y fluido Fecal de ratones inmunizados con r <i>L.lactis</i> -SIP.	18
3.4 Análisis de Inmunoglobulinas mediante ELISA.	19
3.5 Procesamiento de Intestino para la evaluación de células dendríticas.	20
3.6 Obtención de esplenocitos para evaluar la activación de Linfocitos T.	20
3.7 Estimulación <i>in vitro</i> de esplenocitos con rSIP .	20
3.8 Evaluación de Linfocitos T reguladores.	21
3.9 Evaluación de la expresión de Factores de transcripción STAT3, STAT5a y FOXP3 en esplenocitos estimulados con rSIP mediante qRT-PCR.	21

<b>4</b>	<b>Transferencia pasiva de la Inmunidad humoral y celular.</b>	<b>23</b>
	<i>4.1 Obtención de Suero y esplenocitos para el esquema de transferencia pasiva de la inmunidad.</i>	<i>23</i>
	<i>4.2 Purificación de linfocitos T CD4 y CD8.</i>	<i>23</i>
	<i>4.3 Modelo de transferencia pasiva de la inmunidad.</i>	<i>23</i>
	<i>4.4 Evaluación de las Unidades formadoras de colonias de SGB.</i>	<i>24</i>
	<i>4.5 Análisis de anticuerpos IgG de los ratones transferidos con suero y células T.</i>	<i>25</i>
<b>5</b>	<b>Ensayo de Opsonofagocitosis de los ratones inmunizados con rL.lactis-SIP y ratones transferidos con CD4 de ratones rL.lactis-SIP.</b>	<b>25</b>
	<b>Resultados.</b>	<b>27</b>
<b>1</b>	<b>Purificación de Proteína SIP a partir de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>Evaluación del efecto biológico de rL.lactis-SIP.</b>	<b>29</b>
	<i>2.1 Secreción de proteína SIP desde rL.lactis-SIP.</i>	<i>29</i>
	<i>2.2 Estudio del efecto biológico de la disminución de colonización intravaginal de la inmunización con rL.lactis-SIP.</i>	<i>30</i>
<b>3</b>	<b>Caracterización de la respuesta inmune inducida por rL.lactis-SIP.</b>	<b>32</b>
	<i>3.1 Análisis de anticuerpos IgG, subclases e IgA generados por la inmunización con rL.lactis-SIP.</i>	<i>32</i>
	<i>3.2 Evaluación de células dendríticas activadas por la inmunización con rL.lactis-SIP.</i>	<i>35</i>



3.3 Activación de células T CD4 y CD8 por la inmunización con <i>rL.lactis-SIP</i> .	37
3.4 Evaluación de Linfocitos T reguladores estimulados por la inmunización con <i>rL.lactis-SIP</i> .	39
3.5 Evaluación de factores de transcripción STAT3, STAT5 y Foxp3 debido a la inmunización con <i>rL.lactis-SIP</i> .	41
<b>4 Transferencia pasiva de la inmunidad con suero y células T de ratones inmunizados con <i>rL.lactis-SIP</i>.</b>	<b>42</b>
<b>5 Ensayo de Opsonofagocitosis de sueros de ratones inmunizados con <i>rL.lactis-SIP</i> y de la transferencia pasiva de Linfocitos T CD4.</b>	<b>44</b>
<b>Discusión.</b>	<b>47</b>
<b>Conclusiones.</b>	<b>54</b>
<b>Referencias.</b>	<b>55</b>

## Índice de Figuras y Tablas.

### Índice de Figuras

<i>Figura 1</i> : Esquema de inmunización para la evaluación del efecto biológico de rL.lactis-SIP. _	16
<i>Figura 2</i> : Esquema de inmunización para la caracterización de la respuesta inmune de rL.lactis-SIP. _____	17
<i>Figura 3</i> : Esquema de transferencia pasiva de la inmunidad. _____	24
<i>Figura 4</i> :Purificación de proteína SIP mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA. _____	27
<i>Figura 5</i> : Cromatograma purificación proteína SIP mediante SEC-HPLC. _____	28
<i>Figura 6</i> : Purificación proteína SIP por SEC HPLC. _____	29
<i>Figura 7</i> : Expresión de rSIP en rL.lactis-SIP. _____	30
<i>Figura 8</i> : Disminución de la colonización intravaginal de SGB inducida por rL.lactis-SIP. _____	31
<i>Figura 9</i> : Signos clínicos después de la colonización vaginal por SGB. _____	32
<i>Figura 10</i> : Niveles de IgG inducidos por la inmunización con rL.lactis-SIP. _____	33
<i>Figura 11</i> : Niveles de subclases de IgG inducidos por la inmunización de rL.lactis-SIP. _____	34
<i>Figura 12</i> : Niveles de anticuerpos IgA inducidos por la inmunización oral con rL.lactis-SIP. _	35
<i>Figura 13</i> : Gráficos representativos de DC en el intestino para ratones inmunizados con rL.lactis-SIP. _____	36
<i>Figura 14</i> : Activación de células dendríticas en la mucosa intestinal inducido por la inmunización con rL.lactis-SIP. _____	37
<i>Figura 15</i> : Gráficos representativos de la expresión de CD69 inducido por la inmunización con rL.lactis-SIP. _____	38
<i>Figura 16</i> :Activación de células T CD4 y CD8 inducido por la inmunización con rL.lactis-SIP. _____	39
<i>Figura 17</i> : Gráficos representativos de citometría de flujo en células T CD4 activadas. _____	40

<b>Figura 18</b> : Inmunización oral con <i>rL.lactis-SIP</i> disminuye la activación de las células T reguladoras. _____	40
<b>Figura 19</b> : Perfil de genes de esplenocitos estimulados con <i>rL.lactis-SIP</i> . _____	42
<b>Figura 20</b> : Reducción de la colonización vaginal por SGB en el modelo de transferencia pasiva de la inmunidad. _____	43
<b>Figura 21</b> : Niveles de anticuerpos IgG contra SIP en el modelo de transferencia pasiva de la inmunidad. _____	44
<b>Figura 22</b> : Ensayo de opsonofagocitosis de sueros del modelo de inmunización y ratones CD4 del modelo de transferencia pasiva de la inmunidad. _____	45

## Índice de tablas

<b>Tabla 1</b> : Partidores para qRT-PCR. _____	15
---	----

## Abreviaturas

ADN	Acido Desoxirribonucleico.
ADNc	ADN complementario.
APC	“Antigen presenting cell”, Célula presentadora de antígenos.
ARN	Ácido Ribonucleico
BCA	Ácido bicinconinico
BL	Bacterias lácticas
CDC	“Center for Disease Control”, Centro de control de enfermedades
DC	“Dendritic cells”, Células dendríticas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”, Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EOD	“Early onset disease”, Enfermedad de inicio temprano
GALT	“Gut-associated lymphoid tissue”, Tejido linfoide asociado con el intestino
GRAS	“Generally recognized as safe”, Generalmente Reconocido como Seguro
HPLC	“High performance liquid chromatography”, Cromatografía líquida de alta eficacia
IAP	“Intrapartum antibiotic prophylaxis” Profilaxis antibiótica intraparto
Ig	Inmunoglobulina
IgA	Inmunoglobulina del tipo A
IgG	Inmunoglobulina del tipo G
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
LOD	“Late Onset Disease”, Enfermedad de inicio Tardío

MHC	“Major histocompatibility complex”, Complejo mayor de histocompatibilidad
NICE	“Nisin Controlled gene Expression system”, Sistema de expresión génica controlado por nisina
OD	“Optic Density”, Densidad óptica
OPA	Ensayo de Opsonofagocitosis
PBS	Buffer Fosfato Salino
PBS-T	PBS con twen-20 al 0.05%
PCR	“Polymerase chain reaction”, reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfonucleares
RPM	Revoluciones por minuto
rSIP	SIP recombinante
SGB	Streptococco del grupo B
SIP	“Surface immunogenic protein”, Proteína inmunogénica de superficie
TLR	“Toll-like Receptor”, Receptor de tipo Toll
UFC	Unidades formadoras de colonias

## Summary

*Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus, GBS) is an opportunistic pathogen capable of colonizing the genital and gastrointestinal tract of approximately 50% of healthy adults. GBS is associated with premature delivery and fetal death and is the main etiologic agent of neonatal diseases such as pneumonia, septicemia, and meningitis. There are no vaccines licensed to date and there are two vaccines in clinical phase study.

GBS structurally conserved protein antigens are good immunogens and are specific as specific targets for vaccine development. It is in this sense, the surface immunogenic protein (SIP), is a target for the development of a vaccine, due to its high immunogenic capacity and which is highly conserved in all GBS serotypes. It has been described that subcutaneous immunization of recombinant SIP (rSIP) without adjuvants, induces high levels of antibodies and modifies intravaginal colonization. Additionally when immunized with rSIP plus Alum as an adjuvant orally, a protective immune response of the Th1 type is observed, given by the cytokine profile, and Ig subclasses. On the other hand, the intraperitoneal vaccination of rSIP plus AbISCO-100 as an adjuvant was evaluated, where the transfer of CD4 and CD8 cells in the 1: 1 ratio, of vaccinated mice to naive mice, protection against intravaginal infection of GBS. This is the first observation of GBS cellular response, the quality alone can generate protection against GBS. In addition, our laboratory developed a prototype oral vaccine based on *L. lactis* that secretes the SIP protein, which stimulates an immune response characterized by the secretion of antibodies of the IgG and IgA type, a decrease in vaginal colonization of GBS and activation of Lymphocytes T. Based on this background it is proposed that *L. lactis* secretory of SIP generates a cellular immune response capable of generating protection against GBS.

Considering this, is hypothesized that the cellular response stimulated by the oral vaccine based on *L. lactis* that secretes SIP stimulates a protection against intravaginal colonization of GBS in the murine model. To this end, the cellular immune response was characterized by lymphocyte activation markers and it was observed that T lymphocyte activation CD4 and CD8 given by the activation marker CD69 is induced. The expression of FOXP3 transcription factors showed that the vaccine does not generate tolerance since the activation of regulatory T-lymphocytes (CD4+CD25+FOXP3+) was not stimulated.

Finally, it was determined that this cellular response given by the activation of CD4 and CD8 T-lymphocytes confers protection against GBS since these cells purified from mice stimulated with the vaccine are able to decrease the intravaginal colonization of GBS in mice that have never seen the antigen, demonstrating that not only does the vaccine generate activation of T-cells, but also that this activation is functional in controlling the colonization of GBS in the vaginal area.

## Resumen

*Streptococcus agalactiae* (*Streptococco* del grupo B. SGB) es un patógeno oportunista capaz de colonizar el tracto genital y gastrointestinal de aproximadamente un 50% de los adultos sanos. SGB está asociada a parto prematuro y muerte fetal y es el principal agente etiológico de enfermedades neonatales como neumonía, septicemia y meningitis. No existen vacunas licenciadas a la fecha y se encuentran dos vacunas en estudio de fase clínica.

Los antígenos de Proteínas estructuralmente conservadas de SGB son buenos inmunógenos y son considerados como atractivos blancos para el desarrollo de vacunas. En este sentido, la proteína inmunogénica de superficie (SIP), es considerada un blanco para el desarrollo de una vacuna, debido a su alta capacidad inmunogénica y a que es altamente conservada en todos los serotipos de SGB. Se ha descrito que la inmunización subcutánea de SIP recombinante (rSIP) sin adyuvantes, induce altos niveles de anticuerpos y disminuye la colonización intravaginal. Adicionalmente cuando se inmuniza con rSIP más Alum como adyuvante de forma oral se observa una respuesta inmune protectora del tipo Th1, dada por el perfil de citoquinas, y subclases de Ig. Por otro lado, se evaluó la vacunación intraperitoneal de rSIP más AbISCO-100 como adyuvante, donde se observa que la transferencia de células CD4 y CD8 en proporción 1:1, de ratones vacunados hacia ratones naive, genera protección frente a la infección intravaginal de SGB. Esta es la primera observación de respuesta celular de SGB, la cual por si sola es capaz de generar protección contra SGB. Además, nuestro laboratorio desarrolló un prototipo de vacuna oral basada en *L. lactis* que secreta la proteína SIP, la cual estimula una respuesta inmune caracterizada por la secreción de anticuerpos del tipo IgG e IgA, una disminución de la colonización



vaginal de SGB y activación de Linfocitos T. En base a estos antecedentes se propone que *L. lactis* secretora de SIP genera una respuesta inmune celular capaz de generar protección contra SGB.

Considerando esto, se plantea la hipótesis que la respuesta celular estimulada por la vacuna oral en base a *L. lactis* que secreta SIP estimula a una protección contra la colonización intravaginal de SGB en modelo murino. Para lo cual, se caracterizó la respuesta inmune celular mediante marcadores de activación de linfocitos y se observó que se induce activación de linfocitos T CD4 y CD8 dada por el marcador de activación CD69. La expresión de los factores de transcripción FOXP3 demostró que la vacuna no genera tolerancia dado que no se estimuló la activación de linfocitos T reguladores (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>)

Por último, se determinó que esta respuesta celular dada por la activación de linfocitos T CD4 y CD8 confiere protección contra SGB dado que estas células purificadas desde ratones estimulados con la vacuna son capaces de disminuir la colonización intravaginal de SGB en ratones que nunca han visto el antígeno, demostrando que no solamente la vacuna genera activación de células T, sino también que esta activación es funcional para controlar la colonización de SGB en la zona vaginal.

## Introducción

*Streptococcus agalactiae*, o estreptococo del grupo B (SGB), es un diplococo Gram (+), capsulado, anaeróbico facultativo,  $\beta$ -hemolítico en agar sangre de cordero, caracterizado por la presencia del antígeno polisacárido B de Lancefield en la pared celular (Lancefield y Hare, 1935). SGB fue descrito por Nocard y Mollereau (1887) como la causa de mastitis bovina contagiosa. Posteriormente, Lancefield y Hare (1935) lo aislaron desde hisopados vaginales. En los años 70s surge como el patógeno más frecuente en sepsis neonatal y meningitis en países desarrollados (Kalliola y cols., 1999; Fluegge y cols., 2006; Neto, 2008). En humanos, SGB es considerado oportunista, ya que puede actuar como un organismo comensal o como patógeno (Russell y cols., 2017 y Hall y cols., 2017). Se ha estimado que en países desarrollados entre un 20% y un 40% de mujeres sanas están colonizadas asintómicamente por este microorganismo en el tracto gastrointestinal y/o genitourinario (Russell y cols., 2017). Sin embargo, mujeres embarazadas, adultos inmunocomprometidos y ancianos son considerados población de alto riesgo para el desarrollo de la enfermedad invasiva por SGB (Le Doare y Heath, 2013 y Lawn y cols., 2017). En los aislados humanos de SGB se encontró que estos expresan un polisacárido capsular, el cual es considerado el principal factor de virulencia ya que ayuda al microorganismo a evadir los mecanismos de defensa del hospedero. La composición de los polisacáridos capsulares determina 10 serotipos de SGB (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII y IX) cada uno es antigénica y estructuralmente único (Baker y cols., 1973). A pesar de que Baker y cols. (1973) demostraron que todos los serotipos son capaces de causar infección neonatal, los aislados del tipo III están significativamente incrementados entre los infantes con meningitis por SGB (Baker, 1974). Esto varía dependiendo de la zona donde se realiza

el estudio, sin embargo, Un estudio global de aislados invasivos mostró que el serotipo III fue el más frecuentemente identificado en todas las regiones (48,9%), seguido con los serotipos Ia (22,9%), V (9,1%), Ib (7%) y II (6,2%; Le Doare y Heath, 2013). En Chile, se ha determinado que los serotipos Ia, II, III se presentan con mayor frecuencia, siendo el serotipo III el aislado más frecuentemente en pacientes que desarrollaron cuadros invasivos (Boletín ISPCH, 2019;).

Los principales afectados por SGB corresponden a mujeres embarazadas y neonatos. En las primeras la enfermedad se presenta típicamente como una infección del tracto genital, placenta, o del saco amniótico o como bacteriemia de fuente genitourinaria o desconocida. En teoría esta infección no produce muerte materna, pero en un 60 % de ellas produce abortos espontáneos o muerte fetal (Chen y cols., 2013). Cerca del 50% de las mujeres colonizadas transmiten el microorganismo verticalmente al tracto gastrointestinal o respiratorio alto de los neonatos, muchos de los cuales permanecen sanos y 1 al 2% desarrolla la enfermedad de inicio temprano (Edwards y cols., 2011).

Los neonatos presentan dos síndromes clínicos diferentes los que se identifican de acuerdo con la edad de presentación. La enfermedad de inicio temprano (EOD, por sus siglas en inglés Early Onset Disease) y en Enfermedad de inicio tardío (LOD, por sus siglas en inglés Late Onset Disease; Dermer y cols., 2004). EOD se define como una infección que se presenta en los primeros 6 días de vida y que da cuenta de aproximadamente un 60 a un 70 % de todas las enfermedades por SGB. La portación materna de SGB en el tracto gastrointestinal y en el tracto genitourinario es un prerrequisito para EOD, donde la transmisión se produce verticalmente durante o justo antes del parto y es favorecida por complicaciones obstétricas (Whidbey y cols., 2013). La enfermedad puede ocurrir rápidamente; los signos son evidentes en el parto o dentro de las primeras 12 horas en el

90% de los casos y la presentación es típicamente con neumonía o sepsis (Le Doare y Heath, 2013). En contraste, LOD se presenta entre los 7 y 90 días del neonato, es causada principalmente por el serotipo III de SGB y es adquirida perinatalmente, nosocomialmente, a través de la leche materna o por el contacto con otras personas. En la mayoría de los casos se presenta con meningitis (Le Doare y Heath, 2013).

En Chile, se ha descrito que la infección por SGB afecta entre 2 a 4 neonatos por cada 1000 recién nacidos, con una letalidad cercana al 15% (Guzmán y cols., 2001) lo que lo vuelve un importante problema de salud pública. En el año 2010 la incidencia de EOD en EE. UU fue de 0,25 por 1000 nacidos vivos. Esto representa más del 80% de reducción de la incidencia de EOD desde los años 90 cuando se implementó un screening antenatal y con el uso de profilaxis antibiótica para todas las portadoras de SGB. La incidencia de LOD, sin embargo, permanece sin cambio (0,26 por cada 1000 nacidos vivos) (Melin y Efstratiou, 2013). En Chile, al igual que en muchos otros países no se han implementado metodologías de pesquisa y de profilaxis en todos los centros de salud donde acuden mujeres embarazadas, debido a los costos que esto significa (MINSAL, 2015).

### **1. Métodos profilácticos para la infección de SGB**

Actualmente los métodos profilácticos recomendados por la CDC para la infección neonatal de SGB consisten en un tamizaje a las 35 a 37 semanas de gestación, que consiste en toma de muestra vaginal y rectal para análisis microbiológicos. Las mujeres colonizadas con SGB reciben profilaxis con ampicilina, penicilina u otros antibióticos para disminuir el riesgo de transmisión vertical (IAP, “Intrapartum antibiotic profilaxis” (Verani y cols., 2010; Boletín ISPCH, 2019).

En Estados Unidos, la implementación de guías de tamizaje y profilaxis permitió la disminución de más de un 80% de EOD entre los años 1990 y 2010. Sin embargo, estas medidas no produjeron una disminución en la incidencia o cambios en la severidad de las presentaciones clínicas de LOD durante el mismo periodo (Steinhoff, 2013). A pesar de que la implementación de medidas de screening y profilaxis ha tenido un positivo impacto en la disminución de las enfermedades producidas por la infección con SGB, existen limitaciones inherentes a esta metodología. Estas medidas no previenen la muerte fetal ni el parto prematuro. Se ha descrito, que la colonización con SGB en el tracto genitourinario puede ser transitoria, intermitente o persistente lo que produce una gran cantidad de falsos negativos. Además, los partos prematuros impiden una profilaxis adecuada antes del parto. Finalmente, una estrategia de prevención basada en antibióticos es vulnerable a la resistencia antimicrobiana y a la producción de shocks anafilácticos en mujeres alérgicas (Schrag y Verani, 2013).

En este sentido la opción que más promete para la prevención de la infección por SGB en neonatos es el desarrollo de una vacuna. El año 2017 la OMS realizó un llamado a desarrollar una vacuna contra SGB como prioridad para combatir la muerte fetal y el parto prematuro asociado (WHO, 2017) El uso de vacunas en mujeres embarazadas ha demostrado múltiples beneficios para la madre y para el recién nacido, incluyendo el aumento de peso al nacer de infantes nacidos de mujeres inmunizadas (Steinhoff, 2013). Una vacuna para SGB administrada a mujeres embarazadas podría tener el potencial de prevenir la morbilidad de infecciones por SGB en madres con riesgo de prematuridad, evitar abortos involuntarios y muerte fetal, así como también proteger al infante de EOD y LOD a través de la adquisición pasiva de anticuerpos (Madhi y cols., 2013).

Novartis ha desarrollado una vacuna conjugada trivalente (Ia, Ib y III) y realizó un ensayo clínico de fase 1/2 en bebés nacidos de mujeres vacunadas (Madhi y cols., 2013). En los bebés nacidos de los receptores de la vacuna, el nivel de anticuerpos específicos para la vacuna conjugada fue mayor al nacer que a los 43 y 91 días, lo que indica que la inmunización materna tiene la intención de proteger a los bebés mediante una transferencia de anticuerpos específica en la placenta. En 2017, Pfizer comenzó a evaluar una vacuna Hexavalente dirigida a Ia, Ib, II, III y V en un ensayo de fase 1 en voluntarios sanos. A pesar del resultado prometedor del ensayo clínico, el cambio reciente en la distribución de serotipos en todo el mundo requiere el reemplazo de serotipos antiguos o la adición de nuevos serotipos en la vacuna.

Si bien las vacunas conjugadas multivalentes están bien establecidas en términos de su producción, seguridad e inmunogenicidad, tiene varias limitaciones y se han planteado diversas preocupaciones con respecto a su uso. Las limitaciones son la interferencia inmune con un tipo similar de vacunas conjugadas, incluidas las vacunas conjugadas contra *Haemophilus influenzae* tipo b, meningocócicas y neumocócicas, los posibles problemas de reemplazo y cambio de serotipos y la distribución diversa de serotipos en y dentro de las regiones geográficas (Teatero y cols., 2017; Flores y cols., 2015). Los antígenos proteicos conservados estructuralmente entre los serotipos de SGB que son esenciales para la virulencia de SGB y pueden inducir una fuerte respuesta inmune contra la mayoría de las cepas de SGB, se están convirtiendo en las vacunas candidatas más atractivas y rentables (Nuccitelli y cols., 2011; Johri y cols., 2006). MinervaX Inc. anunció recientemente que su vacuna de solo proteína basada en la fusión de dominios N-terminales altamente inmunogénicos de Alpha C y Rib (SGB-NN) mostró resultados positivos de un ensayo de fase I en 240 mujeres adultas sanas (Areschoug y cols., 1999). Todos los sujetos

inmunizados con una o dos dosis de SGB-NN mostraron un aumento de más de 30 veces en los anticuerpos específicos de SGB-NN en comparación con el nivel preinmune (Minervax, 2016). Sin embargo, este prototipo de vacuna no abarca todos los serotipos de SGB, ya que ambas proteínas no se encuentran presentes en ellos. Además, se están investigando muchas proteínas de superficie de SGB, en la etapa preclínica, como vacunas de amplio espectro (Gourlay y cols., 2009; Doro y cols., 2009; Manning y cols., 2006a).

## **2. Proteína Inmunogénica de Superficie.**

La proteína inmunogénica de superficie (SIP) es considerado un agente potencial para generar inmunogenicidad contra los 10 serotipos de SGB (Brodeur y cols., 2000). SIP es una proteína de aproximadamente 53 kDa compuesta por 434 residuos de aminoácidos codificados por un marco abierto de 1305 nucleótidos. Se ha establecido que el gen que codifica para esta molécula (SIP) se encuentra altamente conservado en todos los serotipos de SGB (Brodeur y cols., 2000). En el extremo N-terminal SIP contiene un péptido señal de 25 aminoácidos el cual es escindido en la proteína madura. Esto indica que esta proteína es exportada fuera de la célula, donde puede asociarse con la pared celular de la bacteria y ser accesible a anticuerpos específicos (Brodeur y cols., 2000; Rioux y cols., 2001). La función biológica de la proteína SIP aún no ha sido descrita, sin embargo, se sabe actualmente que es un agonista de Toll-like receptor 2 y 4 (TLR)(Diaz-Dinamarca y cols., 2020). A pesar de no conocer su función, existe numerosa evidencia que apoya el uso de la proteína SIP como una eficiente vacuna para la infección con SGB: (1) Brodeur y cols. (2000) inmunizaron ratones CD-1 con la proteína SIP recombinante purificada y notaron una fuerte respuesta inmune humoral con anticuerpos reactivos contra la proteína SIP recombinante y contra la proteína SIP nativa de todas las cepas de SGB; (2) Rioux y cols. (2001) establecieron que

SIP es considerablemente propenso a iniciar reacción inmune protectora contra infección letal con SGB de todos los serotipos, (3) Manning y cols. (2006b) Evidenciaron la transferencia de anticuerpos desde ratonas preñadas a sus fetos y que estos anticuerpos específicos persisten por al menos 43 días y (4) estudios en humanos demostraron que naturalmente se producen anticuerpos anti-SIP en madres colonizadas. Debido a la patogénesis de SGB es de suma importancia el desarrollo de una vacuna que genere inmunidad al nivel de las mucosas. Una vacuna administrada directamente en una superficie mucosa podría conferir inmunidad celular y humoral local, en otras membranas mucosales y eventualmente inducir inmunidad sistémica (Holmgren y Czerkinsky 2005). Diversos estudios evidenciaron una respuesta inmune humoral en intestino, glándulas salivales y mamarias, y en secreciones vaginales al inmunizar animales oralmente (Cui y cols., 1991).

### **3. Vacunas Orales**

El potencial de la inmunización oral ha sido extensamente evaluado y demostrado en modelos animales. En humanos solo se han aprobado vacunas orales basadas en microorganismos vivos atenuados para polio, tifus y cólera (Hickey y cols., 2010). A pesar de las múltiples ventajas que ofrece la inmunización oral, este método continúa siendo un gran desafío para la comunidad científica, principalmente por el limitado conocimiento que se dispone de la inmunidad de las mucosas y por la incapacidad de determinar la cantidad de antígeno que ingresa al organismo, luego de la exposición al ambiente ácido y rico en enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal (Miquel-Clopes, 2019) Si bien la vacunación oral tiene sus limitantes, los probióticos tienen un gran potencial para ser diseñados en sistemas de administración de vacunas, que pueden generar inmunidad de la



mucosa sin riesgos latentes de patogenicidad, y son capaces de resistir las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (Jiang y cols., 2019).

Uno de los principales probióticos utilizados como vehículo para la entrega de vacunas, corresponde a *Lactococcus lactis*, el cual es un organismo Gram positivo, no patógeno y no invasivo, perteneciente al grupo de bacterias lácticas (BL). Generalmente *L. lactis* es clasificado como un microorganismo "generalmente seguro" (GRAS, por sus siglas en inglés Generally regarded as safe).

En los últimos años se han logrado avances importantes en el desarrollo de herramientas de ingeniería genética y la caracterización molecular de los lactococos (Berlec y cols., 2018). Las herramientas incluyen transformación, disponibilidad de vectores diferentes, integración génica, eliminación de genes, conjugación y sistemas de expresión de genes constitutivos y regulados.

Se ha demostrado en animales y humanos voluntarios que *L. lactis* es capaz de sobrevivir al paso a través de tracto gastrointestinal y no colonizarlo (Klijin y cols., 1995). Sin embargo, *L. lactis* es capaz de expresar antígenos heterólogos al sistema inmune (Ma y cols., 2017). Además, su pared de peptidoglicanos es un adyuvante natural, lo cual puede servir para potenciar la respuesta inmune.

Debido que *L. lactis* carece de la capacidad de multiplicarse *in vivo* (es decir, no coloniza) es recomendado el uso de un sistema de expresión *in vitro* (inducible) que permita garantizar la producción de la proteína de interés antes de la inmunización. En 1995 Kuipers y colaboradores publicaron un documento que describe la autoinducción de la expresión de la bacteriocina nisina lactocócica. En el mismo documento describieron un experimento en el que este mecanismo se usó para dirigir la expresión de una proteína heteróloga alpha-glucuronidasa de *Escherichia coli* mediante la inducción con Nisina, el

cual se denominó Sistema de expresión génica controlado por Nisina (NICE, por sus siglas en inglés nisin-controlled gene expression system). Este sistema permite expresar heterológamente proteínas de interés en *L. lactis* regulando su expresión mediante la inducción con nisina.

#### **4. Prototipo de vacuna basada en la Proteína Inmunogénica de Superficie.**

La Sección de Biotecnología del ISP, actualmente posee una línea de investigación que consiste en la evaluación preclínica de una vacuna oral contra SGB en base a proteína SIP recombinante purificada y mediante el uso de un vector biológico (*L. lactis* y *P.pastori*) que secrete SIP en el intestino. Para llevar a cabo esto se han implementado distintas metodologías para poder evaluar la efectividad de este prototipo de vacuna, primeramente, se montó el modelo murino de colonización intravaginal, en el cual se adaptó, por pasajes múltiples, un aislado clínico chileno de SGB del serotipo III (KU736792). Se logró obtener una colonización estable en el tiempo por a lo menos 16 días post infección, adicionalmente se observó una disminución considerable en el peso de los ratones, lo que se relaciona con una alteración fisiológica en el individuo. Posterior a los 16 días se eutanasiaron los ratones y se encontró un número alto de bacterias en el riñón y el bazo, y en menor cantidad en el pulmón, lo que sugiere un paso de la bacteria desde el tracto vaginal a la sangre con posterior diseminación a los tejidos mencionados (Soto D. y cols., 2018). Este modelo ha sido usado en distintos estudios para la evaluación inmunológica de vacunas contra SGB (Díaz-Dinamarca y cols., 2018a; Díaz-Dinamarca y cols., 2018b; Soto J y cols., 2019; Díaz-Dinamarca y cols., 2020), obteniendo resultados concisos y reproducibles.

La obtención de SIP para la evaluación inmunológica y para el prototipo de vacuna se obtuvo de manera recombinante en la sección de biotecnología del ISP, utilizando el vector

de expresión *pET21a*, y purificando de forma nativa con el sistema Ni-NTA. En el laboratorio se ha optimizado la expresión de SIP utilizando un modelo estadístico de metodología de superficie de respuesta con el diseño de Box-Behn con tres factores y tres niveles, evaluando la temperatura de cultivo, la concentración de inductor (IPTG) y la densidad óptica a la cual se induce (Diaz-Dinamarca y cols., 2018a). De esta manera se obtuvieron las condiciones óptimas de mayor expresión de SIP. Adicionalmente se evaluó si la proteína optimizada inducía una mayor respuesta inmune, contra SGB, inmunizando de forma subcutánea con rSIP y desafiando posteriormente con SGB según lo descrito por Soto y cols. (2018). Se observó que la proteína rSIP optimizada generaba mayor respuesta inmune asociada a una disminución de la colonización intravaginal. Cuando se inmuniza con rSIP de forma oral se observa una respuesta inmune protectora del tipo Th1. Esto fue determinado por el perfil de citoquinas, y subclases de IgG (Diaz-Dinamarca y cols., 2018b). Por otro lado, se evaluó la vacunación intraperitoneal de rSIP más AbISCO-100 como adyuvante, donde se observa que la transferencia de células CD4 y CD8 en proporción 1:1, de ratones vacunados hacia ratones naive, genera protección frente a la infección de SGB (Soto J y cols., 2019). Esto indicaría que una vacuna capaz de generar una respuesta inmune celular contra SGB tiene un alto potencial. Esta es la primera observación de respuesta celular de SGB, la cual por si sola es capaz de generar protección contra SGB. Considerando los beneficios de las vacunas mucosales, se diseñó un prototipo de vacuna basada en *L. lactis*, donde se demostró que la inmunización oral con este probiótico que secreta SIP genera una respuesta inmune caracterizada por la secreción de anticuerpos del tipo IgG e IgA, y una disminución de la colonización vaginal de SGB en modelo murino (Tesis Avendaño 2019). Adicionalmente, en ese trabajo se encontró activación de linfocitos T, lo cual es de suma importancia para el desarrollo de esta Tesis,

ya que no se logró caracterizar que tipo de respuesta T es la que se genera, sin embargo, se puede descartar activación de linfocitos Treg, ya que se observa actividad biológica. La importancia de este estudio radica en que la respuesta celular es algo totalmente nuevo y no estudiado en SGB. En base a estos antecedentes se propone que *L. lactis* secretora de SIP genera una respuesta inmune celular capaz de generar protección contra SGB.

Considerando esto, se plantea que la respuesta celular lleva a una protección contra la infección intravaginal de SGB en modelo murino. Para abordar esto se caracterizará la respuesta inmune celular del prototipo de vacuna de *L. lactis* mediante marcadores de activación de linfocitos, subclases de inmunoglobulina y expresión de los factores de transcripción y se determinará si esta respuesta celular confiere protección contra SGB mediante un ensayo de transferencia pasiva de la inmunidad.

## **Hipótesis**

La respuesta inmune celular inducida por un prototipo de vacuna basada en *Lactococcus lactis* que expresa y secreta SIP recombinante, genera protección contra la colonización intravaginal de SGB en modelo murino.

## **Objetivo General**

Caracterizar la respuesta inmune celular T inducida por la vacuna oral contra *Streptococcus agalactiae* en base a *rL.lactis*-SIP en modelo murino de colonización intravaginal.

## **Objetivos Específicos**

1. Caracterizar la respuesta inmune celular en el prototipo de vacuna basada en *rL.lactis*-SIP.
2. Analizar la inmunidad protectora contra SGB inducida por linfocitos T.

## **Materiales y Métodos**

### **1. Obtención de la Proteína SIP a partir de *E. coli* BL21 (DE3).**

#### *1.1 Obtención de E. coli BL21(DE3) que exprese la Proteína SIP.*

Se preparó un inóculo de células *E. coli* BL21 (DE3) nativas a partir de 10 µl de respaldo bacteriano en un tubo que contiene 3 ml de medio LB estéril. Se incubó toda la noche a 37°C a 220 rpm. Al día siguiente se traspasó el contenido en un matraz de 500 ml con 100 ml de medio LB estéril con Cloranfenicol 34 µg/ml y Estreptomicina 75 µg/ml. Se midió la OD<sub>600nm</sub> y cuando alcanzó un rango 0.5-0.6 se traspasó el contenido en tubos falcón de 50 ml y se centrifugó a 5000g por 20 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con agua estéril, se repitió este proceso 3 veces. Luego el pellet se resuspendió en 1 ml de agua estéril y se traspasó a un tubo Eppendorf de 1.0 – 1.5 ml, se centrifugó a 5000g por 5 minutos a 4°C.

Se tomaron 100 µl de la suspensión anterior que corresponde a células electro competentes *E. coli* BL21(DE3), y 1 µg de plásmido *pET21a:SIP* y se incubó en hielo durante 30 min, luego esta mezcla se traspasó a una cubeta de electroporación previamente enfriada y se expusieron a un pulso eléctrico (Micro-Pulser Bio-Rad) de 2.4 kV. Las células contenidas en la cubeta se traspasaron a un tubo con 1ml de medio LB y se dejó en incubación a 37°C a 220 rpm durante 1 hora, posteriormente se sembró 100 µl sobre placas de agar-LB Ampicilina (10 µg/ml) y se incubaron por 24 hrs a 37°C.

Se seleccionaron aquellas colonias que fueron capaces de crecer en agar LB Ampicilina (10 µg/ml).

### *1.2 Purificación de la Proteína SIP en E. coli BL21(DE3).*

Una colonia recién transformada (Sección 1.1) se incuba a 37°C a 220 rpm en 30 ml de medio LB toda la noche. Al día siguiente se inocula 20 ml del inoculo anterior en 500 ml de medio LB suplementado con glucosa al 0.4% y con ampicilina 50 µg/ml y se deja crecer a 37°C a 220 rpm hasta OD<sub>600nm</sub> 0.5-0.6. alcanzada la OD<sub>600nm</sub> se induce la expresión de SIP con IPTG 1,5mM a 37°C por dos horas. Se centrifuga la bacteria a 7000g por 15 min en una centrifuga Sorval y el pellet se resuspende en Y-PER para su lisis. Se recupera el sobrenadante a partir de una centrifugación a 5000g por 10 min y se purifica mediante cromatografía de afinidad de baja presión mediante el sistema Ni-NTA/His-tag. El sobrenadante se incuba con la resina en buffer de unión (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.5M NaCl; pH 8) toda la noche en agitación con hielo y al día siguiente se carga el contenido en la columna y se lava 3 veces la resina con buffer de lavado (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0.5 M NaCl; 30 mM imidazol; Tween-20 0.1%; pH 8) y luego se eluye de la columna con buffer de elución (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0.5 M NaCl; 250 mM imidazol; pH 8) .

El eludido de la columna se purifica mediante HPLC (Knauer, modelo Manager 500, Binary Pump System) en una columna de exclusión molecular preparativa (300 mm x 21.2 mm x 5 µm) (PHENOMEX) con fase móvil de buffer fosfato (50mM. NaCl 100 mM, pH 7.0) a un flujo de 5 ml/min. Y se utiliza una curva de calibración diseñada previamente para determinar el tiempo de retención de la proteína SIP. La proteína SIP purificada fue analizada mediante SDS-PAGE al 12.5% teñido con azul de coomassie. Y verificado mediante el inmunoensayo rápido Strep B (FONDEF D10I1202). La proteína fue cuantificada con el uso de un kit comercial.

## **2. Evaluación del efecto biológico de la inmunización con *L. lactis* que secreta SIP.**

### *2.1 Preparación de *L. lactis* para la inmunización.*

Se lleva a cabo siguiendo los protocolos ya establecidos (Tesis Avendaño, 2019). Brevemente, se dispone previamente de un clon estable de *L. lactis* NZ9000-pNZ8124:SIP (*rL.lactis*-SIP), el cual se crece a partir de un respaldo de glicerol (-80°C) en agar Cerebro-Corazón suplementado con cloranfenicol 10 µg/ml a 30°C sin agitación. Se inocula a partir de una colonia aislada en 50 ml de medio Cerebro-Corazón suplementado con sacarosa al 20% y cloranfenicol (10µg/ml) y se crece a 30°C sin agitación hasta alcanzar una OD<sub>600nm</sub> de 0.4-0.5 y se añade nisina (10ng/ml) como inductor. Posteriormente se centrifuga 5000g por 15min y se resuspende en 800 µl de PBS, obteniendo aproximadamente 1\*10<sup>11</sup> UFC/ml para inmunizar de forma oral.

### *2.2 Preparación de *Streptococcus agalactiae* para colonización intravaginal.*

Se realiza siguiendo el protocolo descrito por Soto y cols. (2018). Brevemente, una cepa chilena de SGB de serotipo III (KU736792.1) proveniente de un cuadro invasivo (Sección de Biotecnología del ISPCH), se cultiva en medio Todd Hewitt suplementado con ácido nalidíxico (20mg/ml). Se incuba toda la noche a 37°C a 220 rpm y al día siguiente se inocula 25 ml y se cultiva hasta alcanzar OD<sub>600nm</sub> 0.6. Posteriormente, se toma una alícuota de 1 ml bajo mechero, se deposita en un tubo Eppendorff de 1.5 ml y se centrifuga a 10000g por 1 min, se elimina el sobrenadante y se agrega 250 µl de gelatina 10% p/v. Se inocula 50 µl de esta suspensión en el tracto genitourinario de ratones hembra C57BL/6.



### 2.3 Modelo de Inmunización y colonización.

Se utilizan ratones hembra C57BL/6 del Instituto de Salud Pública de Chile. El modelo de inmunización consiste en 12 ratones distribuidos en 3 grupos de 4 individuos. Los ratones son oralmente inmunizados con *rL.lactis*-SIP, *L. lactis* y un grupo control (PBS). La inmunización oral consiste en una dosis de 100  $\mu$ l que se administra con un tubo orogástrico los días 1, 14 y 28. En el día 32 empieza el desafío con SGB donde los días 32 – 36 los animales se tratan con gentamicina (100mg/Kg/día). El día 35 se administra una dosis de 17 $\beta$ Estradiol (0.1 mg). El día 36 el tracto genitourinario de los ratones correspondientes se inocula con 10<sup>7</sup> UFC de SGB en gelatina (10%). El modelo termina el día 41 donde los ratones son anestesiados y eutanasiados obteniendo muestra de lavado vaginal, para observar efecto biológico de la vacuna.(Soto D y cols., 2018) (Figura 1).

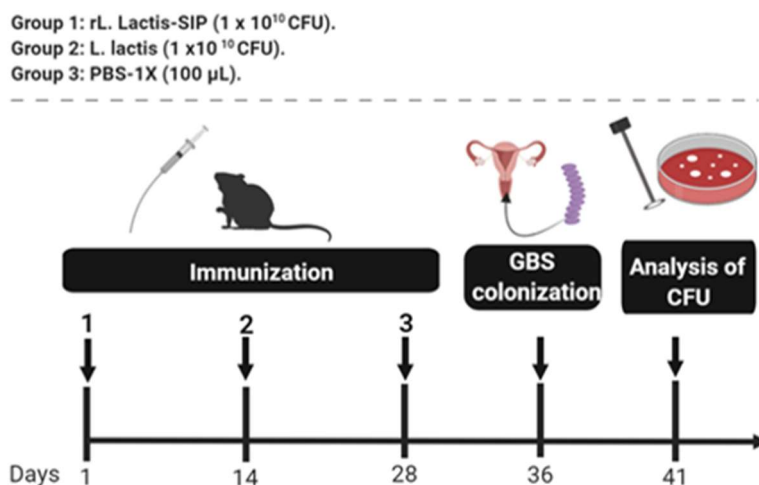


Figura 1 : Esquema de inmunización para la evaluación del efecto biológico de *rL.lactis*-SIP. Consiste en 3 inmunizaciones orales cada 14 días, el día 36 se coloniza el tracto genitourinario con SGB y se analiza las UFC en el lavado vaginal de los ratones 5 días después de la infección.

#### *2.4 Determinación de Unidades formadoras de colonias de SGB.*

Se realiza un lavado genitourinario a todos los ratones del modelo de inmunización, para ello se toman 100 µl de PBS con una micropipeta de 200 µl, luego se introduce en la zona genital aproximadamente 1 cm de la punta de 200 µl, se introduce el líquido y se lava 10 veces. Se cuantifica las UFC de SGB de los lavados obtenidos realizando diluciones seriadas de la muestra original en PBS y se siembran en placas de agar soya tripticasa con sangre de cordero 5%. El ensayo se realiza por triplicado (Soto D y cols., 2018).

### **3. Caracterización de la respuesta inmune de *rL.lactis*-SIP.**

#### *3.1 Modelo de inmunización y toma de muestra.*

Para la caracterización de la respuesta inmune se utilizan ratones hembra C57BL/6 del Instituto de Salud Pública de Chile. El modelo de inmunización consiste en 22 ratones distribuidos en 2 grupos de 8 individuos (*rL.lactis*-SIP y *L.lactis*) y un grupo de 6 (PBS). Los ratones son oralmente inmunizados con 100 µl que se administra con un tubo orogástrico los días 1, 14 28 y 42. El día 43 se eutanasian los ratones y se obtiene muestra de heces, sangre, intestino y bazo. El bazo se mantiene en PBS con Penicilina/Estreptomicina hasta su análisis (Figura 2).

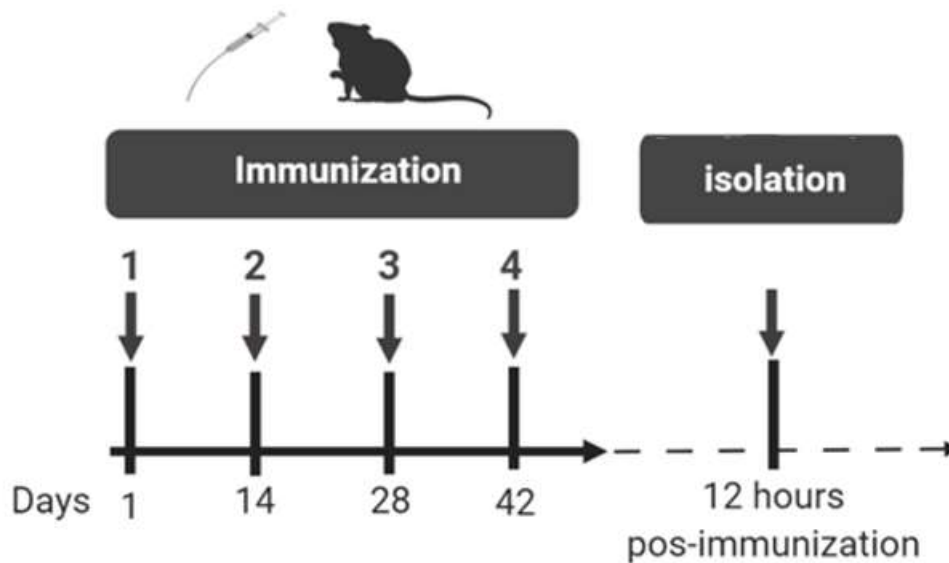


Figura 2 : Esquema de inmunización para la caracterización de la respuesta inmune de *rL.lactis-SIP*. Consiste en 4 inmunizaciones orales cada 14 días, y 12 horas después de la última inmunización se eutanasian los ratones y se aísla muestra de sangre, heces, lavado intestinal, intestino delgado y bazo.

### 3.2 *Obtención del Suero de los ratones inmunizados con rL.lactis-SIP.*

A partir de la sangre recolectada sin anticoagulante en el punto anterior, se obtiene suero incubando por 30 min a 37°C en baño termostático para la formación del coágulo. Se extrae el suero y se centrifuga a 1800g por 7 min y el sobrenadante se guarda a -20°C hasta su análisis.

### 3.3 *Obtención del lavado intestinal y fluido Fecal de ratones inmunizados con rL.lactis-SIP.*

Para el lavado Intestinal se toma el intestino grueso y se introduce una punta de pipeta de 1 ml y se deposita 200 µl de PBS y se repite 3 veces. Se recolecta el lavado, se determina las proteínas totales mediante el método de BCA y se congela a -20°C hasta su análisis. Para la

obtención del fluido fecal se recolectan heces de los ratones y se resuspenden en 5 ml de PBS hasta su completa homogenización, posteriormente se centrifuga a 4000g por 10 min , se recolecta el sobrenadante y se determina las proteínas totales. Se congela el fluido a -20°C hasta su análisis.

#### *3.4 Análisis de Inmunoglobulinas mediante ELISA.*

Para la detección de Inmunoglobulina específica anti-SIP se realiza mediante ELISA indirecto, en sueros para evaluar IgG, IgG2a, IgG1; lavado intestinal y fluido fecal para evaluar IgA. Para determinar IgG se activa una placa de 96 pocillos durante la noche con 1 µg de rSIP por pocillo en un volumen de 50 µL a 4°C. Luego, se lava la placa con PBS y se bloquea durante una hora a 37°C con PBS-leche descremada 5%. Después de lavar la placa con PBS-Tween 20 ( 0.05%, PBS-T) (en triplicado), se agrega el suero de los ratones (por triplicado) a cada pocillo en diluciones en serie de 1:10 a 1:1000 en PBS, se incuba durante 1 hora. A 37°C. Después de los lavados, se agrega el anticuerpo anti-Ig de ratón conjugado a peroxidasa de rábano en una dilución 1:5000 en PBS-leche descremada 1% y se incuba durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se lava la placa y se agrega 50 µl de ULTRA-TMB 1 step ELISA por 20 min. en oscuridad. La reacción se detiene con 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M y se lee absorbancia a 450 nm en lector de placas de ELISA. Para determinar IgG1 e IgG2a se realiza un paso extra de incubación posterior a la muestra que corresponde a los anticuerpos anti IgG1 y anti IgG2a en una dilución 1:2000. Para determinar IgA se utilizan 10 µg de proteínas por pocillo y se incuba con el anticuerpo rata anti-ratón IgA dilución 1:2000 y se utiliza el anticuerpo secundario anti-rata acoplado a HRP.

### *3.5 Procesamiento de Intestino para la evaluación de células dendríticas.*

Se utiliza el procedimiento indicado por Hurasato y cols. (2016). Brevemente, se aíslan células de la mucosa del intestino delgado y las células de la capa epitelial y se purifican por separado utilizando EDTA 2mM, colagenasa tipo II 1,5 mg/ml en solución salina equilibrada de Hank sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Estas células se tiñen con anti-MHC II PE (BD Pharmingen, clon AF6-120.1), anti-CD11b FITC (BD Pharmingen, clon M1 / 70), anti-CD11c (BD Pharmingen, clon HL3), y anti-CD103 APC (BD Pharmingen, clon M290).

### *3.6 Obtención de esplenocitos para evaluar la activación de Linfocitos T.*

Se realiza según lo describe Diaz-Dinamarca y cols. (2018b). Brevemente, bajo condiciones de esterilidad se obtiene asépticamente el bazo de los animales pertenecientes al modelo inmunización. El bazo se disgrega con la ayuda de un cell strainer y se arrastran con PBS. Después se centrifuga a 600g durante 6 min a 4°C, se elimina el sobrenadante y se lisan los eritrocitos con ACK, durante 2 minutos a 37°C. Se detiene la reacción con PBS y se centrifuga a 600g durante 6 min a 4°C, las células se resuspenden en medio RPMI suplementado con 10% SFB, Penicilina/Estreptomicina y β Mercapto de etanol (25mM). Finalmente, se realiza un conteo de las células con azul de Tripán en hemo citómetro a una dilución 1:20. Posteriormente se tiñen las células con anti-CD45 FITC (BD Pharmingen, clon 30-F11), anti-CD4 PE (BD Pharmingen, clon RM4-5) y anti-CD69-APC (BD Pharmingen, clon H1.2F3). Los datos fueron adquiridos usando un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences) y analizados usando el software FlowJo 7.6.1.

### *3.7 Estimulación in vitro de esplenocitos con rSIP .*

Se realiza como lo describió Diaz-Dinamarca y cols. (2018b). Brevemente, se cultiva un número total de  $2 \times 10^5$  células/ml por pocillo en una placa de 96 en triplicado y se estimulan

con 1 µg de rSIP por millón de células y se incuban durante 5 días en presencia de CO<sub>2</sub> (5%).

### *3.8 Evaluación de Linfocitos T reguladores.*

Las células del bazo se evalúan después de cinco días de estimulación con rSIP. Las proporciones de T regs (Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>) en las mezclas de células se analizaron por citometría de flujo utilizando un kit True-Nuclear One-Step Staining Mouse Treg Flow (FOXP3 Alexa Fluor 488 / CD25 PE / CD4 PerCP; Biolegend). Los resultados se expresan como los porcentajes de las células T Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> en las células CD4<sup>+</sup>.

### *3.9 Evaluación de la expresión de Factores de transcripción STAT3, STAT5a y FOXP3 en esplenocitos estimulados con rSIP mediante qRT-PCR.*

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se utiliza la plataforma automatizada NucliSENS-EasyMAG (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia) para purificar los ácidos nucleicos totales de 600,000 esplenocitos contenidos en 500 µl de medio RPMI-1640 obtenido de la sección 3.7. Los eluidos se tratan con DNasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) Para degradar el ADN en la muestra. El ARN resultante se mantiene a -20 ° C hasta la síntesis de ADNc. La mezcla para la síntesis de ADNc se desarrolla siguiendo las instrucciones del fabricante (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) Utilizando el siguiente perfil térmico: 25 ° C durante 5 minutos, 42 ° C durante 45 minutos, 95 ° C durante 5 minutos, y paso indefinido final a 4 ° C.

Los factores de transcripción se analizan utilizando el conjunto de partidores indicados en la tabla 1

Tabla 1: Partidores para qRT-PCR.

Partidor	Secuencia
$\beta$ actina - F	5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3',
$\beta$ actina - R	5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3'
FOXP3 - F	5'-TTTCACCTATGCCACCCTTATC-3',
FOXP3 - R	5'-GTAGGCGAACATGCGAGTAA-3';
STAT5a - F	5'-CCGAAACCTCTGGAATCTGAA-3'
STAT5a - R	5'-GGTCTGGGAACACGTAGATAAG-3';
STAT3 - F	5'-CCCATATCGTCTGAAACTCCTAAC-3',
STAT3 - R	5'-TCACCCCACTCACTCATTTC - 3'.

Todas las amplificaciones por PCR en tiempo real se llevan a cabo en mezclas de reacción de 20  $\mu$ l que contienen 2  $\mu$ l de templado de ADNc, 10  $\mu$ l de Brilliant II SYBR Green QPCR 2X (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), 1  $\mu$ l de cada cebador (0.5  $\mu$ M) y 6  $\mu$ l de agua desionizada.

Todas las reacciones se realizan por cuadruplicado usando un termociclador Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.). Se usa el siguiente perfil térmico en cada caso: desnaturalización inicial a 95 ° C durante 10 minutos, 40 ciclos de 95 ° C durante 30 segundos y 60 ° C durante 1 minuto. Antes de cada ejecución de PCR, se configura el software MxPro con una opción de cantidad relativa utilizando el grupo de ratones inmunizados con PBS como calibrador y el gen de  $\beta$ -actina (Actb) como referencia.

#### **4. Transferencia pasiva de la Inmunidad humoral y celular.**

##### *4.1 Obtención de Suero y esplenocitos para el esquema de transferencia pasiva de la inmunidad.*

Se utiliza el mismo grupo de ratones indicados en la sección 3.1. Se procesa el bazo como se indica anteriormente y se realiza un pool de esplenocitos para cada grupo y se cultivan en botellas de cultivo de 10 ml y se estimulan con 5 µg de rSIP por millón de células durante 4 días a 37°C en presencia de CO<sub>2</sub> (5%) El suero utilizado corresponde a un pool de los ratones de los grupos experimentales.

##### *4.2 Purificación de linfocitos T CD4 y CD8.*

Se realiza como lo describe Soto J y cols. (2019), con algunas modificaciones. Células T CD4 y CD8 se purifican a partir de los esplenocitos de la sección anterior. Utilizando el kit comercial Mojo Sort, el cual mediante anticuerpos contra marcadores de superficie selecciona negativamente los linfocitos T CD4 o CD8. Se toman 10<sup>7</sup> esplenocitos y se resuspenden en PBS , se incuban con el set de anticuerpos conjugados a biotina junto con beads magnéticas con streptavidina en tubos de citometría. Y se introducen en el magneto durante 5 min y, sin retirar el tubo se recolecta las células purificadas.

##### *4.3 Modelo de transferencia pasiva de la inmunidad.*

Se realiza como lo describe Soto J y cols. (2019), con algunas modificaciones. Ratones hembra C57BL/6 son usados para evaluar la transferencia pasiva de la inmunidad. Suero o células T de los ratones inmunizados fueron transferidos a ratones naive por inyección endovenosa. El número de células corresponde a 10<sup>6</sup> células. El modelo consiste en la inyección endovenosa de linfocitos T CD4, CD8, y una mezcla en proporción 1:1 de ambos



y sueros provenientes del grupo PBS y *rL.lactis*-SIP para cada uno de los anteriores. Un día después de la transferencia todos los grupos experimentales fueron infectados con SGB como se indica anteriormente (Figura 3).

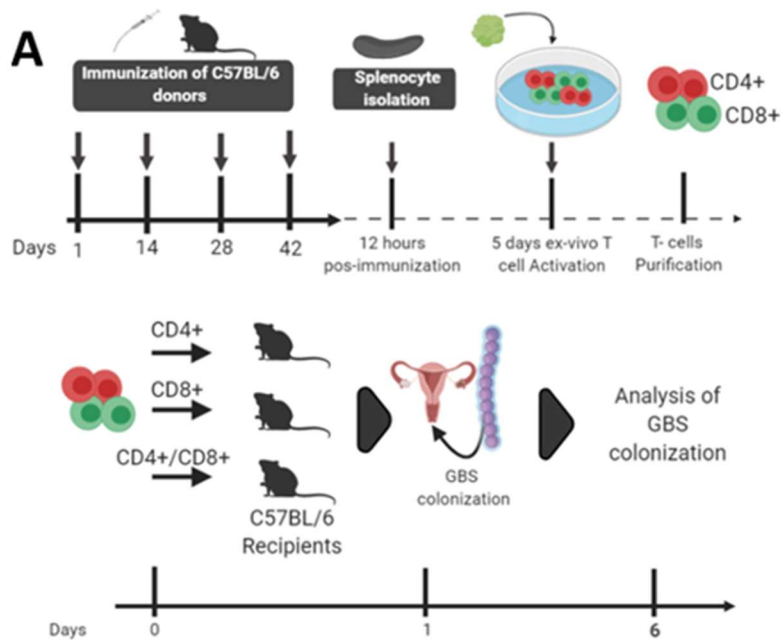


Figura 3 : Esquema de transferencia pasiva de la inmunidad. Calendario de inmunización de ratones dadores de suero y células T (superior), consiste en 4 inmunizaciones dada 14 días. 12 horas después de la última inmunización se aisló el bazo y se purificaron linfocitos T CD4 y CD8 como se describe más adelante. En la parte inferior se muestra el calendario de transferencia ratones receptores de suero y células T, un día después de la transferencia vía endovenosa, se colonizó vía intravaginal con SGB y 5 días después se analizó la disminución de la colonización de SGB en el lavado vaginal de los ratones.

#### 4.4 Evaluación de las Unidades formadoras de colonias de SGB.

Se determinará las UFC de SGB, tal y como se ha descrito en el punto 2.4

#### *4.5 Análisis de anticuerpos IgG de los ratones transferidos con suero y células T.*

Tres semanas después del lavado vaginal, se extrajo sangre de los ratones, y se obtiene el suero como se indica anteriormente. Se evalúa los niveles de anticuerpos IgG anti-SIP mediante ELISA como se indica con anterioridad.

#### **5. Ensayo de Opsonofagocitosis de los ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP y ratones transferidos con CD4 de ratones *rL.lactis*-SIP.**

Se realiza este ensayo a los sueros de los ratones inmunizados para la caracterización de la respuesta inmune, y para los ratones de la transferencia. El ensayo se realiza cultivando una cepa hemolítica de SGB (Código Genbank: KU736792) en tubos sellados que contiene caldo Todd-Hewitt. Las bacterias se lavan con PBS, se resuspenden en medio Eagle modificado y se utilizan en el ensayo. Las células premyelocíticas HL-60 (ATCC, CCL-240) se cultivan y diferencian como se describe en Diaz-Dinamarca y cols. (2018b). El ensayo de opsonofagocitosis (OPA) se realiza en suero de ratones inmunizados como se describe por Guttormsen y cols. (2009) Brevemente, la reacción se realiza en placas de 96 pocillos (Nunc) en solución salina equilibrada de Hank (HBSS, Gibco). Para cada mezcla de reacción, se añade suero a evaluar inactivado por calor (56 ° C durante 30 minutos; HI), bacterias SGB, células HL-60 diferenciadas y 10% de complemento de conejo bebé (Cedarlane).

Las reacciones de control se llevan a cabo sin complemento o anticuerpo, células efectoras o todos los componentes excepto SGB. La relación de células efectoras a células SGB es 90: 1. Las mezclas de reacción se incuban a 37 ° C durante 1 h con agitación. Se extraen alícuotas después de la incubación y se colocan en placas de agar con sangre, que se

incubar durante la noche a 37 ° C en 5% de CO<sub>2</sub>. El porcentaje de muerte se evalúa según lo descrito por Romero-Saavedra y cols. (2015) al comparar los recuentos de colonias a los 60 min (t<sub>60</sub>) que no contenían PMN (PMN<sub>neg</sub>) con los recuentos de colonias de un tubo que incluía los cuatro componentes del ensayo.

## Resultados

### 1. Purificación de Proteína SIP a partir de *E. coli* BL21 (DE3).

La proteína rSIP se obtuvo a partir de un cultivo de *E. coli* transformada con el vector *pET21a*:SIP de acuerdo con lo descrito en metodología. Se logró purificar la proteína SIP en altas cantidades, cerca de 10 mg de repetidas experiencias de purificación. Se evaluó la pureza de la proteína obtenida mediante SDS-PAGE (Figura 4a), la pureza se evidencia por la disminución de bandas adicionales rSIP que tiene un peso de 57kD. Para confirmar que la proteína purificada corresponde a rSIP, se realizó un inmunoensayo con el kit Strep B (FONDEF D10I1202) (Figura 4b), la positividad del ensayo indica que la muestra corresponde a la proteína SIP. La proteína necesaria para los análisis posteriores se requiere de dos condiciones: Ser de alta pureza, y estar libre de LPS. Para cumplir con las condiciones se procedió a purificar mediante cromatografía de exclusión molecular.

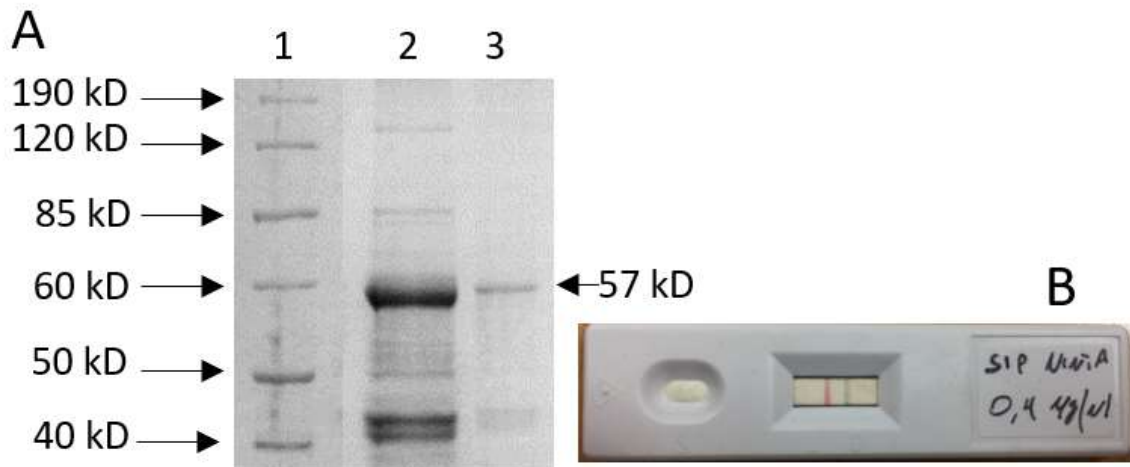


Figura 4: Purificación de proteína SIP mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA. A) Gel SDS page denaturante al 12.5%. Carril 1, Estandar de peso Molecular, Benchmark™ Prestained Protein Ladder, 10 to 190 kDa. Carril 2, Extracto de *E.coli* BL21 (DE3) pre purificación. Carril 3, Proteína SIP post purificación

mediante NiNTA. B) Inmunoensayo STREP B (FONDEF D10I1202) de la muestra correspondiente al carril 3 de la figura B.

La Proteina purificada por NiNTA fue concentrada mediante filtros Amicon Ultra-15, membrana PLTK Ultracel-PL 30 kDa, hasta disminuir en 10 veces su volumen. Posteriormente fue filtrada con un filtro de 0.2um e inyectada en un HPLC preparativo como se indica en la metodoligia (Figura 5). Utilizando una curva de calibracion diseñada anteriormente (Diaz-Dinamarca y cols., 2018a) se recolectaron las frecciones en torno al tiempo de retencion de 12 min y se identificaron y analizo su pureza mediante SDS-PAGE (Figura 6a), se puede observar que las bandas perdieron las contaminaciones observadas previamente y tenemos una banda unica. Para verificar la identidad de la proteina se realizo un inmuno ensayo con el kit Strep B (FONDEF D10I1202) (Figura 6b) con esto se verifico que lo purificado mediante SEC-HPLC corresponde a la proteina SIP. En total se obtuvo viales de 1 ml con una concentracion entre 0.6 y 1.5 mg/ml, logrando asi purificar 4 mg de proteina SIP total de alta pureza, suficiente para realizar la estimulacion de eplencitos indicada mas adelante.

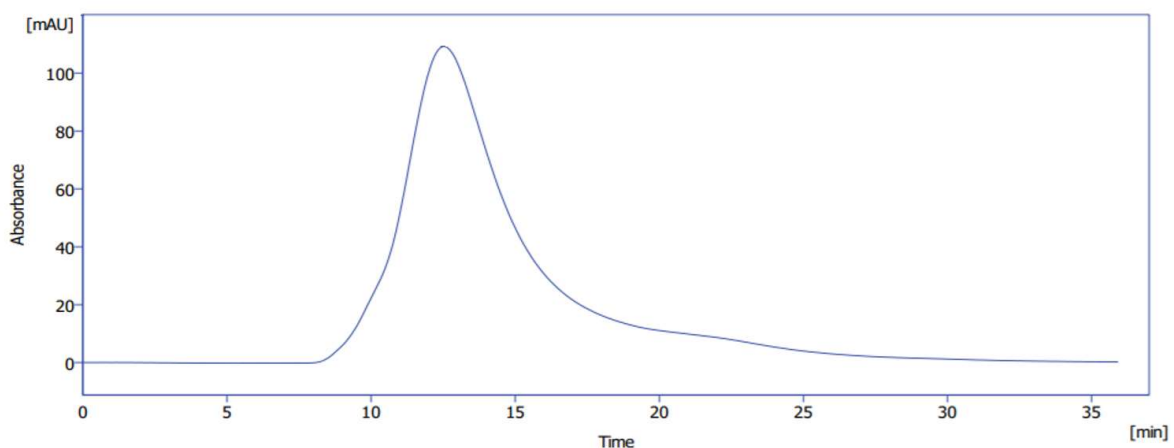


Figura 5 : Cromatograma purificación proteína SIP mediante SEC-HPLC. Cromatograma de la purificación de rSIP usando un detector UV a una longitud de onda de 280nm. Se utilizó de fase móvil buffer fosfato (50mM. NaCl 100 mM, pH 7.0) a un flujo de 5 ml/min. La recolección se realizó por fracciones de 1 ml desde los 10 min hasta los 15 min). B) Inmunoensayo STREP B (FONDEF D10I1202) de la muestra correspondiente al carril 2,3,4 de la figura B.

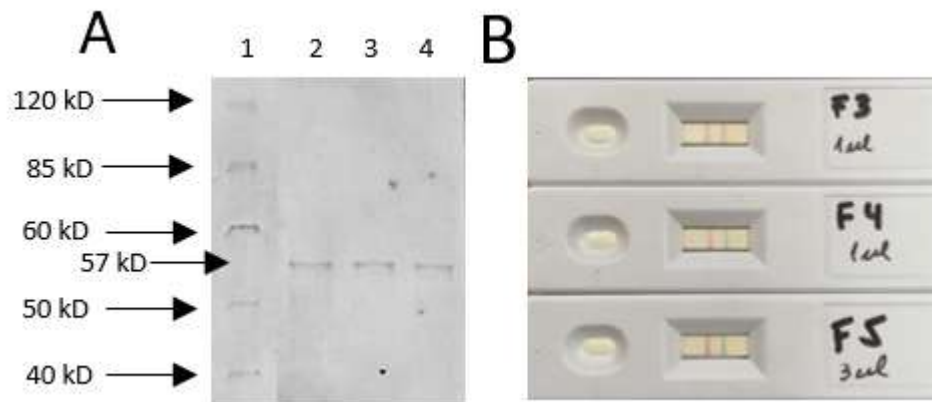


Figura 6 : Purificación proteína SIP por SEC HPLC. SDS Page al 12.5%. Carril 1, Estandar de peso Molecular, Benchmark™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa. Carril 2-4, Proteína SIP post purificación mediante HPLC.

## 2. Evaluación del efecto biológico de r*L.lactis*-SIP

### 2.1. Secreción de proteína SIP desde r*L.lactis*-SIP.

La proteína inmunogénica de superficie de SGB se expresó usando *L. lactis* recombinante bajo el control del promotor nisA. Se comprobó que r*L.lactis*-SIP es capaz de secretar la proteína SIP al medio extracelular mediante análisis de SDS-PAGE (Figura 7A) y Western blot (Figura 7B) utilizando un anticuerpo policlonal anti-SIP (Díaz-Dinamarca y cols., 2018a).

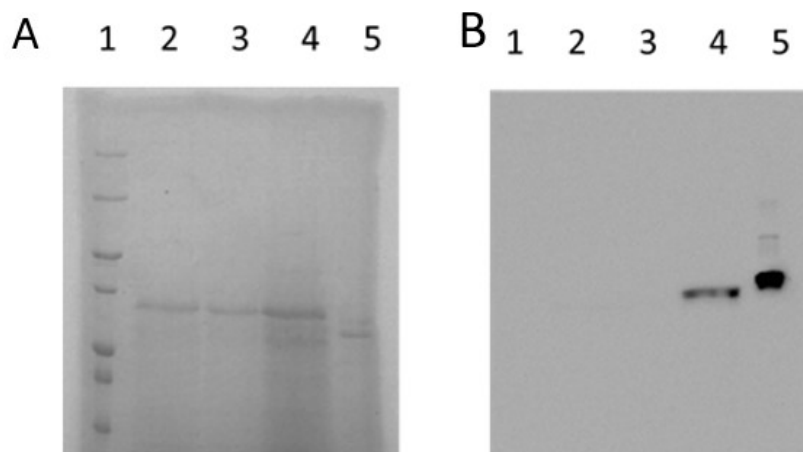


Figura 7 : Expresión de rSIP en *rL.lactis-SIP*. Después de la inducción con nisina, la proteína rSIP producida por *rL.lactis-SIP* se analizó mediante SDS-PAGE 12.5% (A) y Western blot (B ). Carril 1: Estándar de peso Molecular, PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa. Carril 2: Sobrenadante de cultivo de *L. lactis*. Carril 3: Sobrenadante de cultivo de *rL.lactis-SIP* sin nisina. Carril 4: Sobrenadante de cultivo de *rL.lactis-SIP* con nisina. Carril 5: rSIP purificado por columna de cromatografía de afinidad Ni-NTA.

## 2.2 Estudio del efecto biológico de la disminución de colonización intravaginal de la inmunización con *rL.lactis-SIP*.

Díaz-Dinamarca y col. (2018b) reportaron que la inmunización oral con SIP y alum induce inmunidad protectora y reduce la colonización vaginal por SGB. Por eso se evaluó si la inmunización oral con *rL.lactis-SIP* disminuye la colonización intravaginal de SGB. Los ratones C57BL/6 hembras se inmunizaron como se describe en materiales y métodos

Se observó una gran cantidad de SGB en el tracto vaginal de grupos inmunizados con *L. lactis* y los grupos de control PBS. En contraste, en ratones inmunizados por vía oral con *rL.lactis-SIP*, se detectó una disminución significativa en la colonización del tracto vaginal por SGB (\*\*\*)  $p < 0.001$ ) (Figura 8).

También se observó sintomatología clínica asociada como la temperatura corporal y el aumento de peso. Los animales inmunizados con *rL.lactis*-SIP aumentaron en peso respecto a los grupos controles y sus temperaturas corporales variaron menos que los animales control inmunizados con PBS y *L. lactis* (Figura 9). Estos resultados sugieren que la inmunización oral con rSIP usando *rL.lactis*-SIP promueve la erradicación de SGB del tracto vaginal, sin embargo, es necesario evaluar porque mecanismos podría estar produciéndose este efecto.

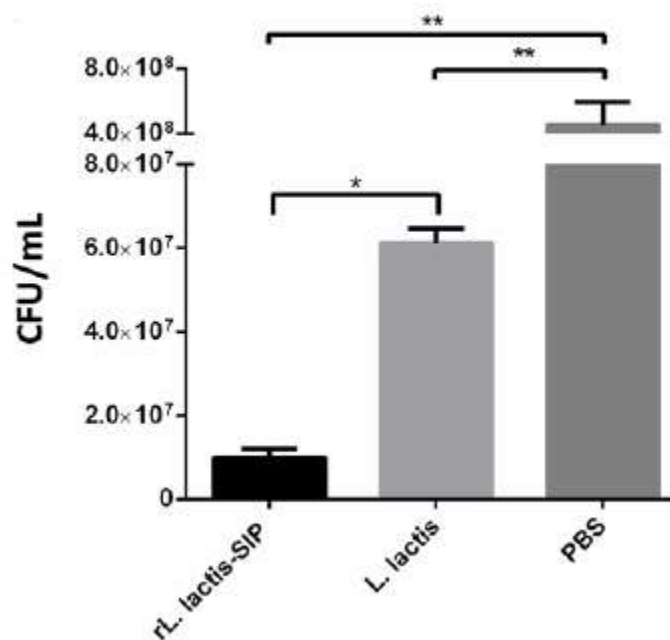


Figura 8 : Disminución de la colonización intravaginal de SGB inducida por *rL.lactis*-SIP. UFC/ml de SGB en lavado vaginal a los 5 días después de la colonización. Las diluciones en serie se colocaron en placas para cuantificar las UFC de la colonización del tracto genitourinario por SGB. Los datos se muestran como media ± desviación estándar de 4 ratones en cada grupo. Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control PBS (\*\* p <0.01; \*\*\* p <0.001). Gráfico corresponde a una sola observación (n=4) con triplicado de técnica).



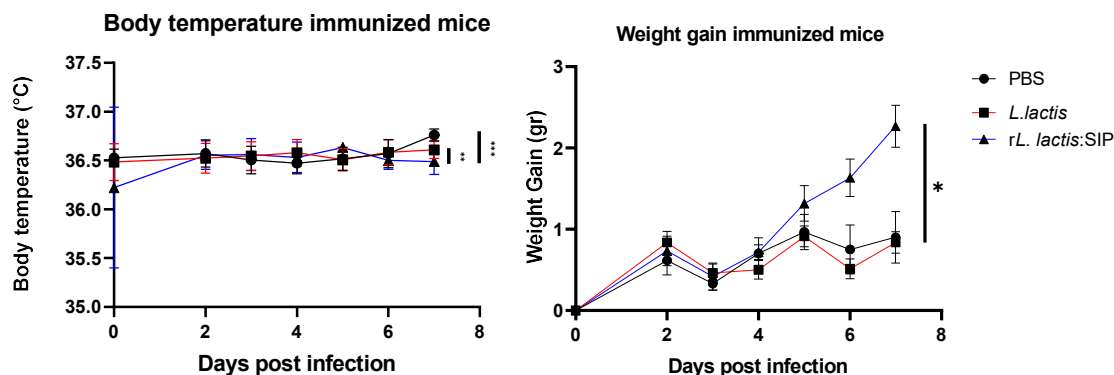


Figura 9 : Signos clínicos después de la colonización vaginal por SGB. A la Izquierda se muestra la temperatura corporal debido a la colonización por SGB para los ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP fueron significativamente más bajos que los ratones inmunizados con *L.lactis* y PBS (\*\*\*,  $p < 0,001$  y \*\*  $p < 0,01$  por ANOVA de dos vías). A la derecha se muestra la pérdida de peso corporal después de la colonización vaginal por SGB para los ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP fueron significativamente más altos que los ratones inmunizados con *L.lactis* y PBS (\*  $p < 0,05$  por ANOVA de dos vías). Gráficos corresponden a una sola observación ( $n=4$ ), con triplicado de técnica.

### 3. Caracterización de la respuesta inmune inducida por *rL.lactis*-SIP.

#### 3.1 Análisis de anticuerpos IgG, subclases e IgA generados por la inmunización con *rL.lactis*-SIP.

Se probó si la inmunización oral con *rL.lactis*-SIP puede inducir una respuesta inmune específica contra SIP de SGB. Se detectaron inmunoglobulinas específicas contra SIP en suero, lavado intestinal y heces a las 12 h después de la última inmunización usando ELISA. Se indujeron altos niveles de respuesta de IgG cuando los ratones se inmunizaron con *rL.lactis*-SIP (\*\*\*)  $p < 0,0001$ ) en comparación con los niveles de IgG inducidos por los grupos de control *L.lactis* y PBS. En contraste, no se observaron diferencias significativas

en los sueros de los ratones inmunizados con *L. lactis* en comparación con el grupo de control PBS (ns,  $p > 0.05$ ) (Figura 10).

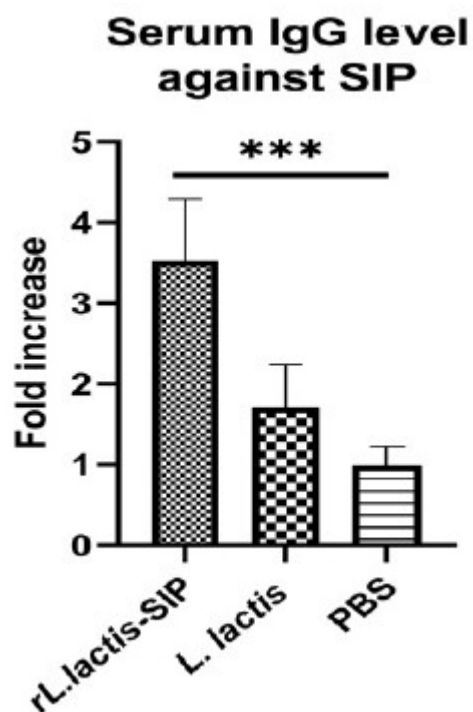


Figura 10 : Niveles de IgG inducidos por la inmunización con *rL.lactis*-SIP. La secreción de anticuerpos IgG específicos contra SIP se midió por ELISA a partir de los sueros recogidos de ratones inmunizados sin colonización por SGB (8 ratones por grupo). Las barras indican la media  $\pm$  desviación estándar de los anticuerpos. \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0.05$  por ANOVA de comparación múltiple para ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP en comparación con ratones inmunizados con PBS. Gráfico corresponde a dos observaciones independientes ( $n=4$  por observación), con triplicado de técnica.

También se determinó el perfil Th1 / Th2 asociados a las subclases de IgG de ratones inmunizados. Se detectaron mayores niveles de IgG1 e IgG2a en ratones inmunizados con

*rL.lactis*-SIP en comparación con los grupos de control (Figura 11). Esto sugiere un equilibrio en la respuesta del tipo Th1 / Th2 del grupo inmunizado con *rL.lactis*-SIP.

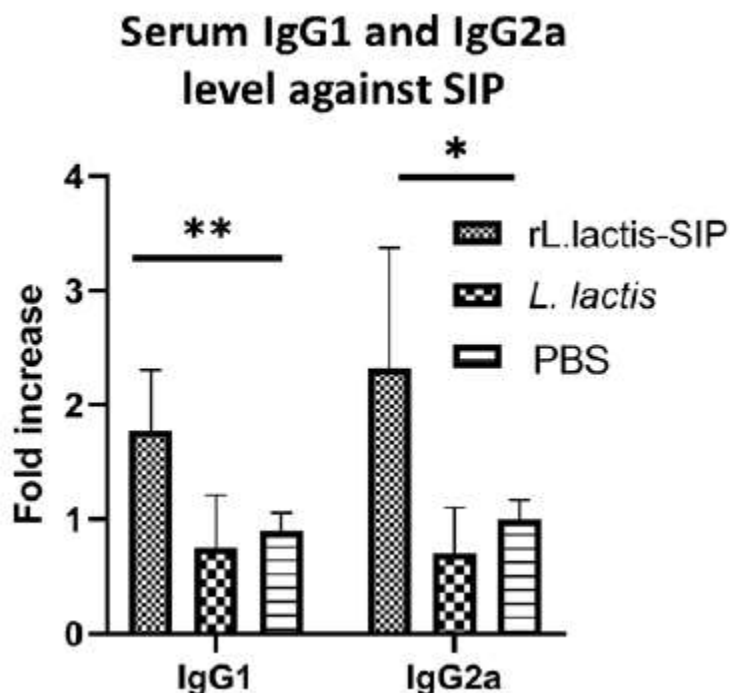


Figura 11 : Niveles de subclases de IgG inducidos por la inmunización de *rL.lactis*-SIP. La secreción de anticuerpos de tipo IgG1 e IgG2a específicos contra SIP se midió por ELISA a partir de los sueros recogidos de ratones inmunizados sin colonización por SGB (8 ratones por grupo). Las barras indican la media  $\pm$  desviación estándar de los anticuerpos. \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0.05$  por ANOVA de comparación múltiple para ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP en comparación con ratones inmunizados con PBS. Gráfico corresponde a dos observaciones independientes ( $n=4$  por observación), con triplicado de técnica.

También se evaluó la respuesta mucosal en ratones vacunados. Para este propósito, se determinaron los niveles de IgA específicos de SIP en lavados de muestras fecales y el intestino delgado (Figuras 12) . Los resultados indicaron que los ratones vacunados tenían

niveles más altos de IgA de la mucosa específica de antígeno en comparación con los ratones control que recibieron PBS o *L. lactis* (\*  $p < 0.05$ ).

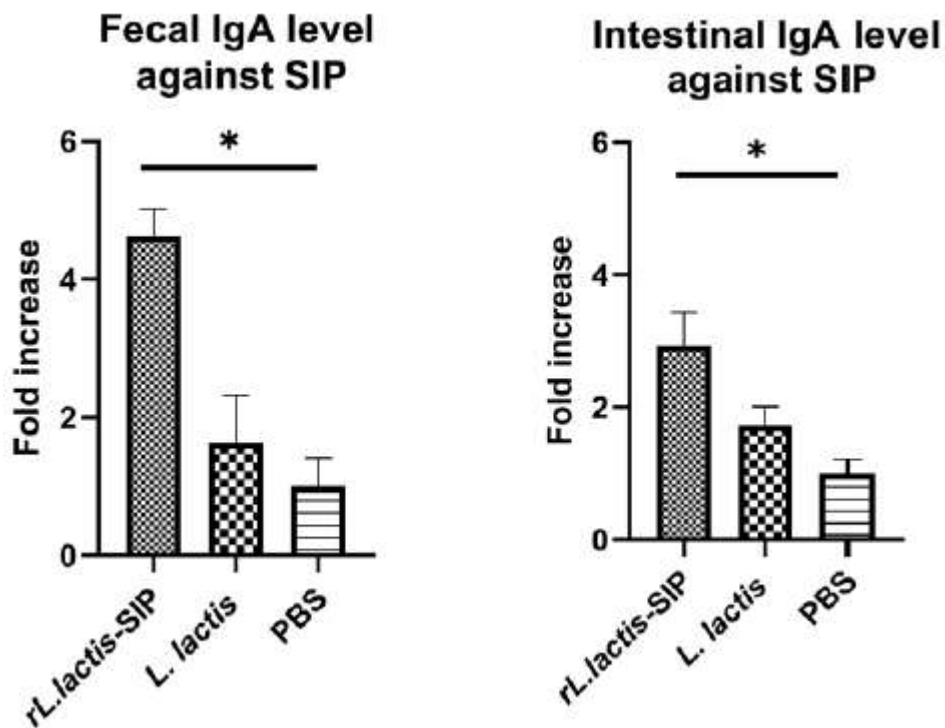


Figura 12 : Niveles de anticuerpos IgA inducidos por la inmunización oral con r*L.lactis*-SIP. La secreción de anticuerpos IgA específicos contra SIP se midió por ELISA a partir de las heces (izquierda) y del lavado intestinal (derecha) recogidos de ratones inmunizados sin colonización por SGB (8 ratones por grupo). Las barras indican la media  $\pm$  desviación estándar de los anticuerpos. \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*  $p < 0.05$  por ANOVA de comparación múltiple para ratones inmunizados con r*L.lactis*-SIP en comparación con ratones inmunizados con PBS. Gráfico corresponde a dos observaciones independientes ( $n=4$  por observación), con triplicado de técnica.

### 3.2 Evaluación de células dendríticas activadas por la inmunización con r*L.lactis*-SIP.

Los ratones fueron inmunizados vía oral para caracterizar la población de células dendríticas en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) después de una vacuna oral.

A las 12 h de la última inmunización. Las células presentadoras de antígeno (APC) fueron inmunofenotipadas por citometría de flujo (Figura 13) . La vacuna oral basada en *rL.lactis*-SIP aumentó significativamente el número de DC MHC II<sup>high</sup> CD103+ CD11b+ y DCs MHC II<sup>high</sup> CD103 + CD11c + en el GALT en comparación con los grupos de control PBS y *L. lactis* (\*\*, p <0.01) (Figuras 14) . Por el contrario, no se observó un aumento significativo en las DC de subtipo de ratones inmunizados con *L. lactis* en comparación con el grupo de control PBS (ns, p> 0.05).

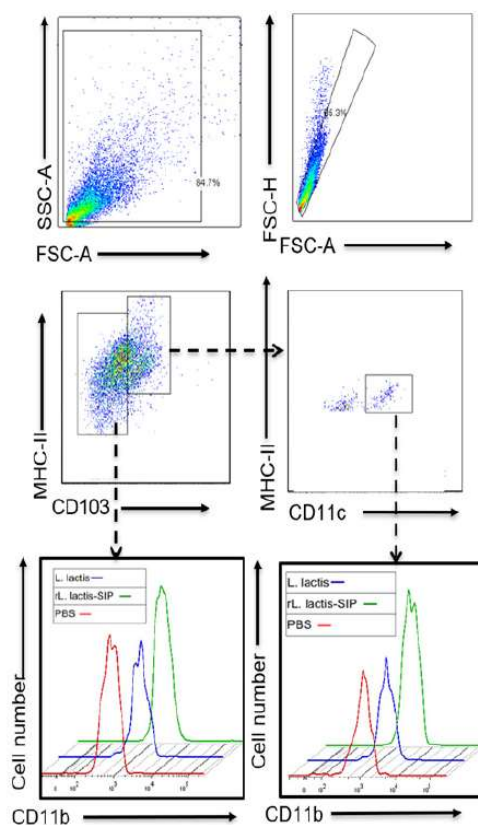


Figura 13: Gráficos representativos de DC en el intestino para ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP. Se analizaron CD de tejido linfoide asociado al intestino (GALT) CD45+ MHC II + para determinar la expresión celular de CD103+ y CD103 negativa y, en consecuencia, las poblaciones resultantes se separaron para CD11c y CD11b.

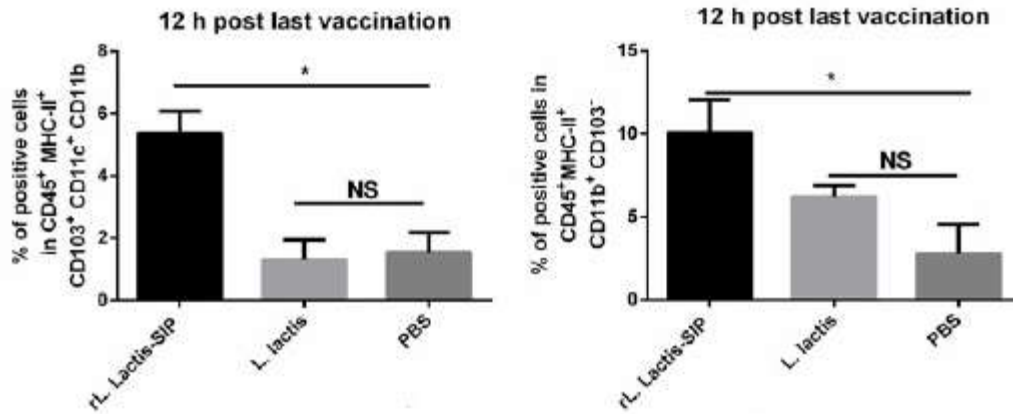


Figura 14 : Activación de células dendríticas en la mucosa intestinal inducido por la inmunización con *rL.lactis*-SIP. A las 12 h después de la última inmunización, las células se aislaron de todo el intestino delgado y se tiñeron con anti CD45- anti-MHC-II, anti-CD103 + anti-CD11b + y anti- CD11c +. Los niveles de poblaciones indicadas de células que expresan diversos niveles de CD11c (izquierda) y CD11b (derecha) se analizaron adicionalmente para la expresión de CD103. Se adquirió un total de 30,000 eventos en todos los experimentos utilizando un citómetro FACSverse y se analizó con el software Flowjo. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar de 8 ratones en cada grupo. Los asteriscos indican una diferencia significativa con respecto al control de PBS (no significativo [ns]; \*\*  $p < 0.01$ ). Gráfico corresponde a dos observaciones independientes (n=4 por observación), con triplicado de técnica.

El subconjunto CD11c y CD11b de células CD103 + está relacionado con la diferenciación de células Th1 y Th17 en respuesta a los ligandos TLR (Uematsu y cols., 2008), lo que sugiere que *rL.lactis*-SIP aumenta la absorción de antígeno en las APC en la mucosa gastrointestinal durante al menos 12 h.

### 3.3 Activación de células T CD4 y CD8 por la inmunización con *rL.lactis*-SIP.

Se evaluó la respuesta inmune celular inducida por la vacunación con *rL.lactis*-SIP, para ello ratones C57BL/6 fueron inmunizados con *rL.lactis*-SIP, *L. lactis* o PBS-1X. Se obtuvieron suspensiones de células individuales de los bazo de ratones inmunizados y fueron inmunofenotipadas por citometría de flujo (Figura 15) Como se muestra en las Figura 16, los porcentajes de CD45 + CD8 + CD69 +; CD45 + CD4 + CD69 + en bazo de ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP (\*\*,  $p < 0.001$ ) es mayor, pero no en ratones inmunizados con *L. lactis* en comparación con el grupo de control PBS (ns,  $p > 0.05$ ).

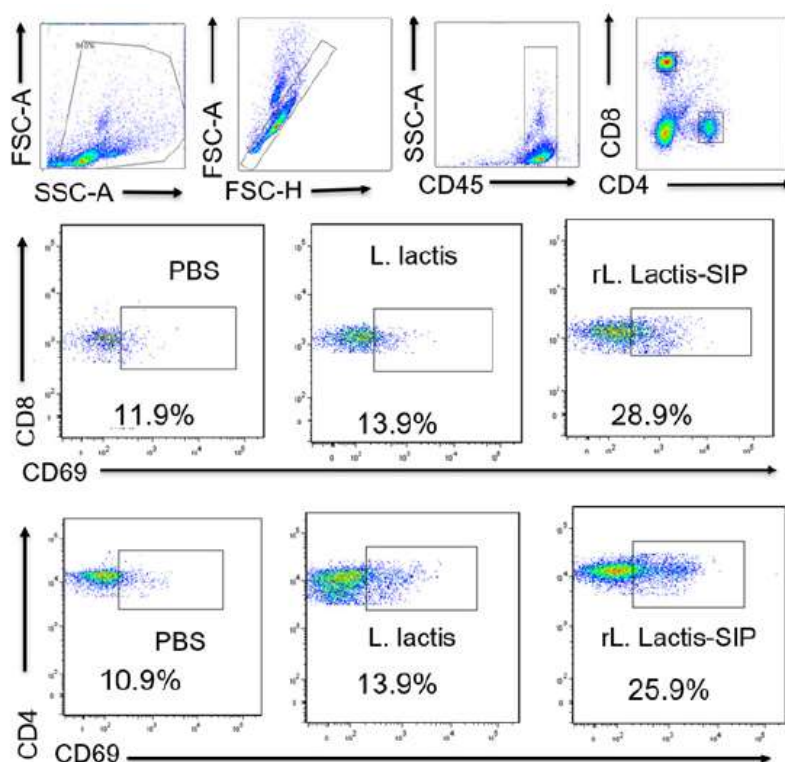


Figura 15: Gráficos representativos de la expresión de CD69 inducido por la inmunización con *rL.lactis*-SIP. A las 24 h después de la última inmunización con *rL.lactis*-SIP, *L. lactis* o PBS. Se analizaron las poblaciones CD8+ y CD4+.

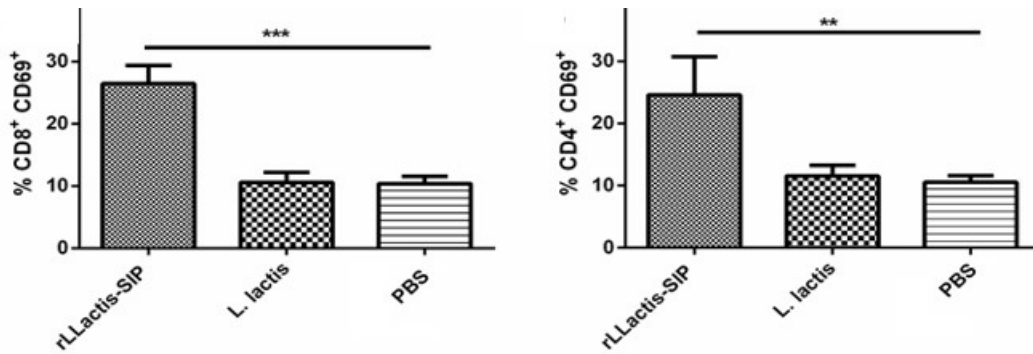


Figura 16 :Activación de células T CD4 y CD8 inducido por la inmunización con *rL.lactis-SIP*. Detección por citometría de flujo de la expresión de células T CD69 ,CD8 (izquierda) y CD4 (derecha) derivadas de ratones inmunizados *rL.lactis-SIP*, *L. lactis* y con PBS, respectivamente. Las células del bazo se tiñeron con anticuerpos anti-CD8, anti-CD4 y anti-CD69 y se analizaron por citometría de flujo. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar de 8 ratones en cada grupo. Los asteriscos indican una diferencia significativa frente a los ratones inmunizados con PBS (no significativo [ns]; \*\*  $p < 0.01$ ). Gráfico corresponde a dos observaciones independientes (n=4 por observación).

### 3.4 Evaluación de Linfocitos T reguladores estimulados por la inmunización con *rL.lactis-SIP*.

Los linfocitos T reguladores, caracterizado por el fenotipo CD4 + CD25 + Foxp3 + es uno de los grandes mediadores de la tolerancia inmunogénica. Los antígenos orales son constantemente presentados al sistema inmunes, por lo que la tolerancia es un factor importante para evaluar en este trabajo.

La vacuna generó una disminución en linfocitos T reguladores en comparación con el grupo PBS (Figuras 17, 18), lo que se correlaciona con una mayor activación del subconjunto de células T CD69 +(Figura 16).



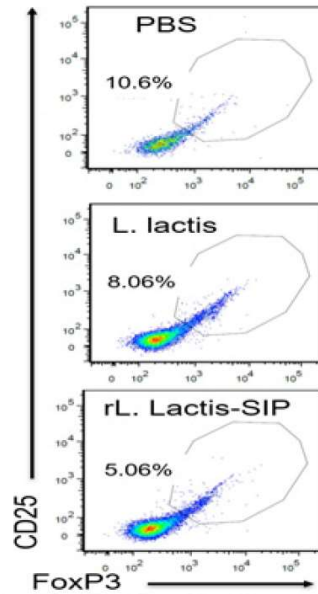


Figura 17: Gráficos representativos de citometría de flujo en células T CD4 activadas. Se cuantifica el porcentaje de Tregs CD4 + CD25 + Foxp3 + obtenidos de esplenocitos.

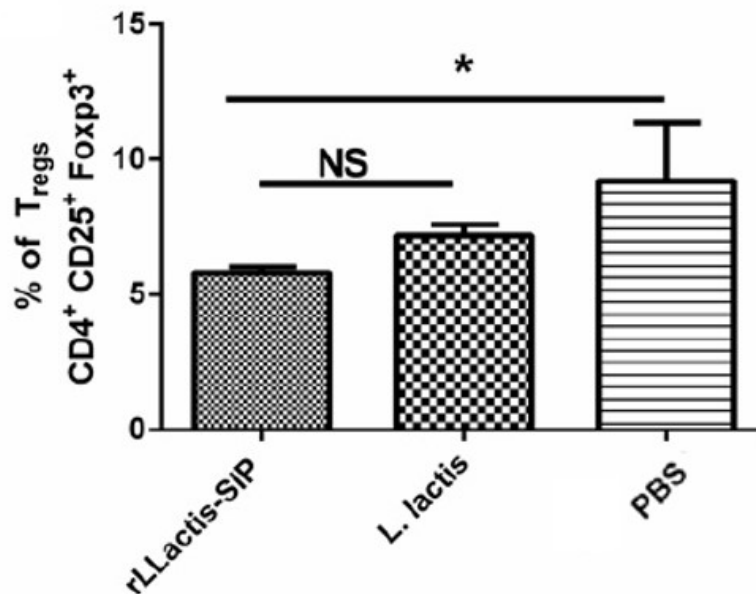


Figura 18 : Inmunización oral con *rL.lactis*-SIP disminuye la activación de las células T reguladoras. Detección por citometría de flujo de la expresión CD4 + CD25 + Foxp3 por células T derivadas ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP, *L. lactis* y PBS. Las células de bazo se tiñeron con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-Foxp3 y se analizaron por citometría de flujo. Se adquirió un total de 30,000 eventos en todos los experimentos utilizando un citómetro FACSverse y se analizó con el software FlowJo. Los datos se muestran

como media  $\pm$  desviación estándar de 8 ratones en cada grupo. Los asteriscos indican una diferencia significativa frente a los ratones inmunizados con PBS (no significativo [ns]; \*\* p <0.01). Gráfico corresponde a dos observaciones independientes (n=4 por observación).

### *3.5 Evaluación de factores de transcripción STAT3, STAT5 y Foxp3 debido a la inmunización con rL.lactis-SIP.*

Además, para apoyar la activación de las células T, se evaluó la expresión génica de genes citotóxicos relacionados, STAT3 y STAT5. En este contexto, STAT3 compite con STAT5 por la unión al ADN en todo el genoma, y la activación sostenida de STAT3 puede desplazar a STAT5, inhibiendo así la expresión de genes citotóxicos (Ciucci y cols., 2017). Se observaron aumentos significativos en STAT5 en respuesta a *rL.lactis-SIP* y *L. lactis* como en comparación con PBS-1X. También se observaron niveles bajos de STAT3 en grupos de células obtenidas de *rL.lactis-SIP* y *L. lactis* en comparación con ratones inmunizados con PBS. Además, los niveles de expresión de Foxp3 disminuyeron en ratones inmunizados con *rL.lactis-SIP* en comparación con *L. lactis* y ratones inmunizados con PBS (Figura 19). Colectivamente, el fenotipo de células T activadas observado en esplenocitos de los ratones inmunizados con *rL.lactis-SIP* son compatibles con la respuesta inmune celular.

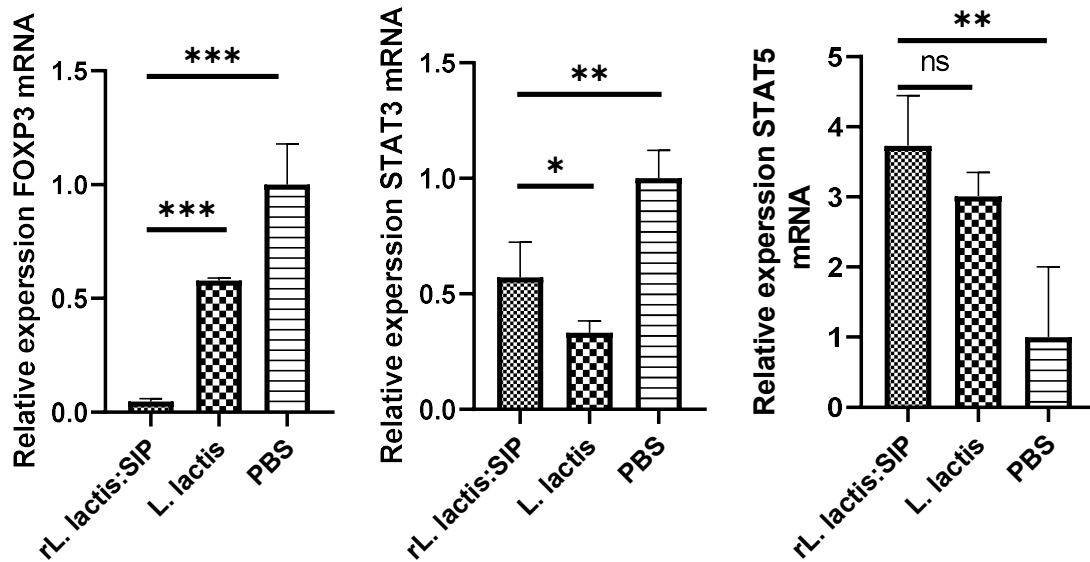


Figura 19 : Perfil de genes de esplenocitos estimulados con rL.lactis-SIP. La activación de los esplenocitos obtenidos a partir de ratones de la inmunización oral se determinó mediante perfiles de genes de Foxp3(izquierda), STAT-3 (centro) y STAT-5(derecha) a partir de ARN total de esplenocitos. Los esplenocitos se estimularon ex vivo durante 4 días con rSIP purificada. Los datos se expresan como el aumento en comparación con los ratones inmunizados con PBS en la expresión del número de copias del gen Foxp3, STAT-3 y STAT-5 por copias del gen de la  $\beta$ -actina. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estándar de 4 ratones en cada grupo. Los asteriscos indican una diferencia entre los grupos (\* P <0.05; \*\* P <0.01; \*\*\* P <0.001). Gráfico corresponde a dos observaciones independientes (n=4 por observación), con triplicado de técnica.

#### 4. Transferencia pasiva de la inmunidad con suero y células T de ratones inmunizados con rL.lactis-SIP.

Luego se evaluó si las células T de los ratones inmunizados con rL.lactis-SIP tienen la capacidad de mediar protección contra la colonización por SGB. Con este fin, se obtuvieron esplenocitos de ratones inmunizados y se trataron in vitro con 5  $\mu$ g/ml de rSIP purificada de *E. coli* para inducir la activación de células T específicas contra SIP.

Para evaluar si las células T CD4 y CD8 específicas de SIP tienen la capacidad de conferir protección contra la colonización por SGB, se aislaron las células T CD4+ y CD8+ purificadas de ratones *rL.lactis*-SIP y PBS-1X inmunizados y transferidos a ratones C57BL/6 no inmunizados. Una suspensión unicelular de células T CD4 +, CD8 + y una mezcla 1: 1 de estos se transfirieron a ratones sin tratamiento previo vía intravenosa. A las 24 h después de la transferencia de células T, los ratones receptores fueron colonizados con SGB. Por otro lado, también se obtuvo suero de los ratones inmunizados y se transfirió a ratones sin tratamiento previo de la misma manera. Esto se realizó con el objetivo de determinar si la respuesta humoral podría disminuir la colonización de SGB por sí misma. Los ratones que recibieron células T y suero de ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP mostraron una disminución en la colonización vaginal por SGB en comparación con los ratones que recibieron células T y suero de ratones inmunizados con PBS (\*\*,  $p < 0.01$ )(Figura 20).

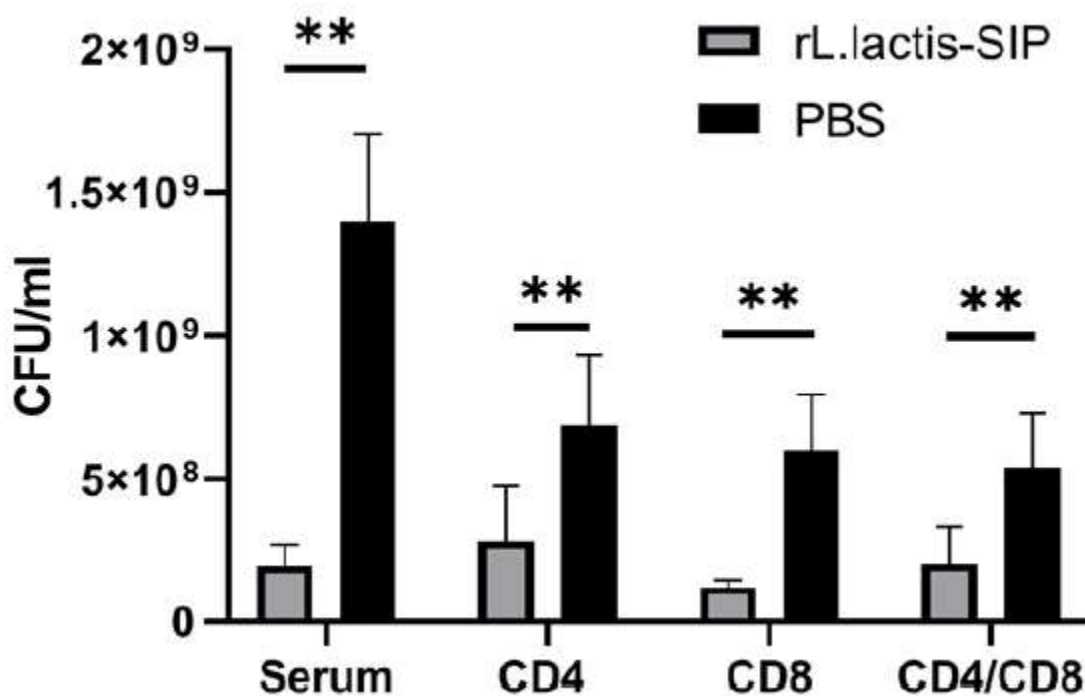


Figura 20 : Reducción de la colonización vaginal por SGB en el modelo de transferencia pasiva de la inmunidad. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estandar de 8 ratones en cada grupo. Los asteriscos indican una diferencia entre los grupos (\*\* P <0.01; \*\*\* P <0.001). Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estandar de 8 ratones en cada grupo. Los asteriscos indican una diferencia entre los grupos (\* P <0.05; \*\* P <0.01; \*\*\*\* P <0.0001). Gráfico corresponde a dos observaciones independientes (n=3 por observación), con triplicado de técnica.

Después de 3 semanas de colonización por SGB, los ratones receptores que recibieron células T CD4 de los ratones inmunizados con r*L.lactis*-SIP y colonizados con SGB tenían un alto nivel de anticuerpos contra SIP en comparación con los animales control (\*\*\*, p <0,001) (Figuras 21).

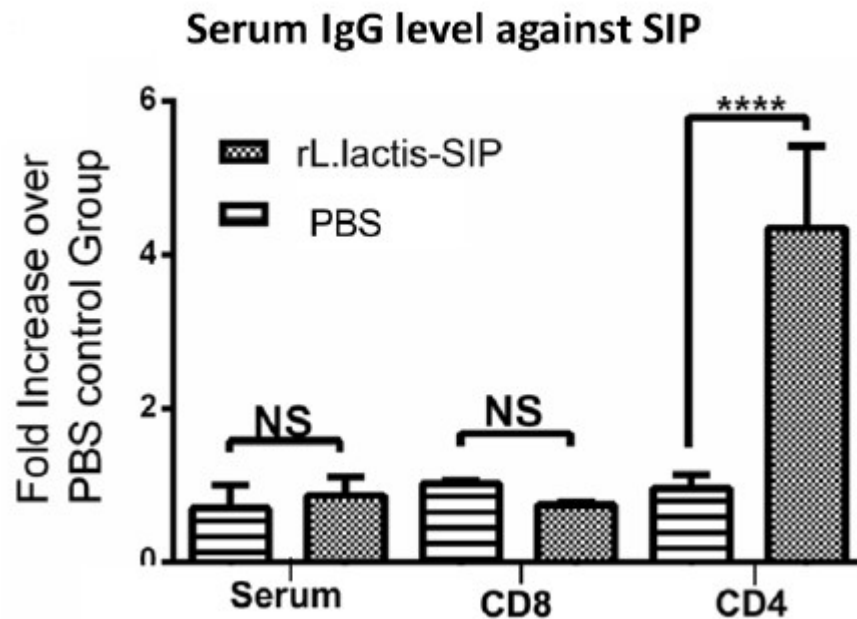


Figura 21 : Niveles de anticuerpos IgG contra SIP en el modelo de transferencia pasiva de la inmunidad. A ratones que recibieron transferencias de células T y suero y se infectaron después, Se midió por ELISA de los sueros recogidos 14 días después de la colonización. Los datos se muestran como media  $\pm$  desviación estandar

de 8 ratones en cada grupo. Los asteriscos indican una diferencia entre los grupos (\*\*\* P <0.001). Gráfico corresponde a dos observaciones independientes (n=3 por observación), con triplicado de técnica.

### **5. Ensayo de Opsonofagocitosis de sueros de ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP y de la transferencia pasiva de Linfocitos T CD4.**

Actualmente está definido que una vacuna genera protección contra SGB cuando hay anticuerpos opsonizantes, por esto se evaluó si los anticuerpos generados por los ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP y los receptores que recibieron células T CD4+ de los ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP pueden generar opsonofagocitosis de SGB *in vitro* según el ensayo OPA.

Este ensayo *in vitro* se correlaciona con la eficacia efectiva de una vacuna para SGB (Choi y cols., 2018). Hubo un aumento en el porcentaje de muerte de SGB en sueros obtenidos de ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP y ratones que recibieron células T CD4 + de ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP y colonizados con SGB (Figura 22). Estos datos sugieren que la transferencia pasiva de inmunidad humoral y celular de ratones que fueron inmunizados por vía oral con *rL.lactis*-SIP en animales sin tratamiento previo puede reducir significativamente la colonización por SGB según la colonización vaginal *in vivo* y el ensayo de OPA *in vitro*.

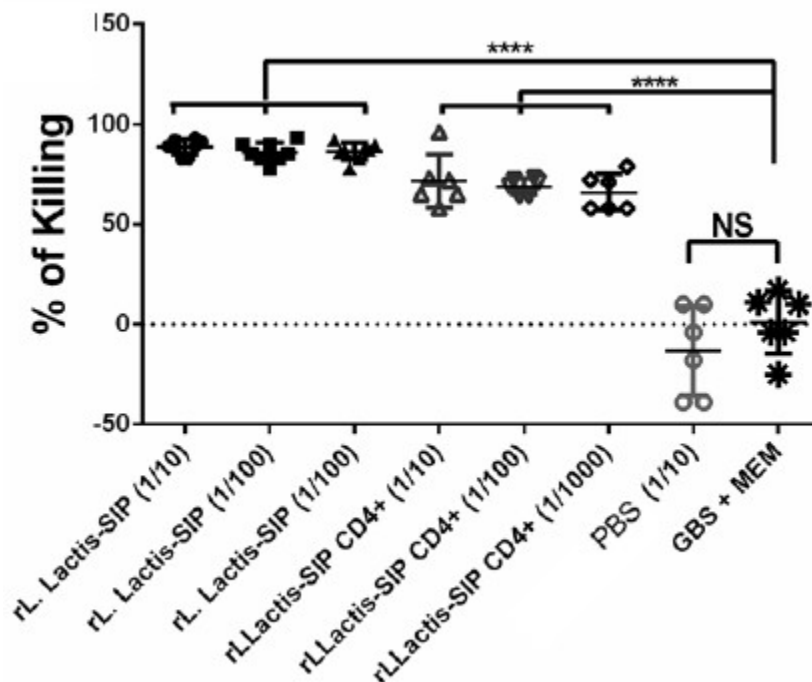


Figura 22 : Ensayo de opsonofagocitosis de sueros del modelo de inmunización y ratones CD4 del modelo de transferencia pasiva de la inmunidad. El ensayo de opsonofagocitosis (OPA) se usó para probar la destrucción opsonizante de SGB a partir de anticuerpos secretados por la vacuna *rL.lactis-SIP* y de ratones de transferencia de células t CD4 +. Se muestra el OPA del suero en presencia de SGB, complemento de conejo C y células HL-60. El ensayo de OPA se realizó con una relación de células efectoras a SGB de 90: 1. Se indica el porcentaje de muerte de los sueros y la dilución correspondiente utilizada en el OPA. Las reacciones de control contenían diluciones que carecían de anticuerpo o complemento o que contenían suero de conejo normal que daban lugar a un crecimiento de SGB. \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$  por ANOVA de prueba múltiple para diluciones de suero de 1:10, 1: 100 y 1: 1000 en comparación con el cultivo normal de SGB en presencia de MEM. Gráfico corresponde a dos observaciones independientes (n=4, para *rL.lactis-SIP* y de n=3 para *rLlactis-SIP CD4+*, por observación), con triplicado de técnica.

## Discusión

SGB es una bacteria que comúnmente coloniza el tracto genitourinario femenino durante el embarazo. Esta colonización se ha asociado con infecciones neonatales graves, y ha habido pocos cambios en las tasas de mortalidad desde 1990 (Seale y cols., 2017). La colonización materna de SGB es una condición necesaria para la infección fetal ascendente, la muerte fetal y la enfermedad de inicio temprano en los recién nacidos y constituye un factor de riesgo para la enfermedad de inicio tardío (Beradi y cols., 2014; Verani y cols., 2010). Actualmente, no existe una vacuna con licencia para SGB que pueda prevenir la infección bacteriana (Giorgakoudi y cols., 2018; Lin y cols., 2018).

SGB coloniza los organismos a través de las superficies mucosas, por lo que una vacunación oral podría ser un enfoque excelente para inducir una respuesta inmune protectora sistémica y mucosal (Bermúdez-Humarán y cols., 2005). En este contexto, muchos estudios han destacado la administración oral de cepas probióticas específicas (como *L. lactis*) para mejorar las respuestas inmunes locales y sistémicas y posiblemente mejorar la inmunización (Bermúdez-Humarán y cols., 2011). Además, se han obtenido datos de ensayos clínicos con vacunas contra el VPH-16 basadas en *L. lactis* (Mohseni y cols., 2020).

En este estudio, se demuestra que los ratones inmunizados con una nueva cepa de *L. lactis* que expresa SIP (*rL.lactis*-SIP) induce inmunidad humoral y de células T protectoras contra SGB. La especificidad y eficacia de la vacuna fue respaldada por su capacidad para estimular DC intestinales y disminuir la colonización bacteriana vaginal. Además, la transferencia de células T específicas y suero de los ratones inmunizados con *rL.lactis*-SIP condujeron a la eliminación de SGB en los animales receptores. Esto demuestra que se



requiere la expresión de SIP por *L. lactis* para generar inmunidad bacteriana. El mecanismo de protección parece depender de la inducción de células T helper específicas que pueden promover inmunoglobulinas funcionales en respuesta a las inmunizaciones con SIP.

La proteína SIP se considera un objetivo potencial para el desarrollo de una vacuna contra SGB porque está altamente conservado entre todos los serotipos de SGB e induce una respuesta inmune humoral y celular protectora (Rioux y cols., 2001; Soto y cols., 2019). Además, rSIP es un agonista de Toll-Like Receptor 2 (TLR2) y TLR4, lo que sugiere un doble papel en la generación de respuestas inmunes innatas y adaptativas contra la infección bacteriana (Díaz-Dinamarca y cols., 2020). Anteriormente, se demostró que una estrategia de vacunación oral compuesta de SIP más el adyuvante alum induce una reducción de la colonización vaginal por SGB, así como también de anticuerpos opsonizantes (Díaz-Dinamarca y cols., 2018b). La administración oral de SIP sin un adyuvante generó un aumento en los niveles de IgG e IgA, pero no fue suficiente para generar protección (Díaz-Dinamarca y cols., 2018). Esto podría deberse al bajo pH gástrico y a la digestión proteolítica por enzimas gastrointestinales (Coria y cols., 2019). Esto sugiere que rSIP necesita un vehículo efectivo para la administración a nivel del intestino delgado para generar protección contra SGB.

Para este propósito, se utilizó *L. lactis* porque se reconoce como seguro (GRAS), no patógeno y no colonizador, lo que reduce el riesgo de causar tolerancia debido a la persistencia del antígeno en las mucosas (Wells y Schofield, 1996; Steidler y cols., 1998). El uso de *L. lactis* como vehículo de administración de antígenos, se usa como estrategia de vacunación y ha demostrado la capacidad de presentar antígenos al sistema inmunitario e inducir respuestas inmunitarias tanto humorales como mediadas por células en los sitios de la mucosa y a nivel sistémico. Un aspecto que debe considerarse es el efecto de la vía de

inmunización de *L. lactis* en la respuesta inmune, dado que se ha observado que la inmunogenicidad depende de la ruta de inoculación (Norton y cols., 1994; Azizpour y cols., 2017) En este contexto, rSIP producida por *L. lactis* NZ9000 se construyó para lograr la administración directa de la proteína en el tracto gastrointestinal. La diferencia de peso molecular de la proteína SIP de *E. coli* y de *L.lactis* se debe a que esta última se le escindió de su secuencia un dominio de unión a peptidoglicano, para facilitar su secreción. Se demostró la capacidad de *rL.lactis*-SIP para disminuir la colonización vaginal por SGB en ratones C57BL6, lo que se correlacionó con las respuestas inmunes protectoras celulares y humorales. Esta última característica fue validada por las propiedades protectoras de la vacuna para SGB: aumentos de IgG, IgA y anticuerpos opsonizantes en suero (Choi y cols., 2018). Por lo tanto, esta vacuna oral favorece la aceptación de *rL.lactis*-SIP como un posible vector de inmunización humana.

Una respuesta inmune efectiva por parte de la mucosa requiere la producción de IgG sérica e IgA secretora (sIgA). A nivel de la mucosa, sIgA actúa como la primera defensa contra los patógenos a través de la exclusión inmunológica (Stokes y cols., 1975). Esta función protectora es independiente de la cascada del sistema del complemento, que previene el daño inflamatorio de la barrera epitelial (Macpherson y cols., 2008). La administración de *rL.lactis*-SIP a nivel de la mucosa gastrointestinal generó una respuesta sIgA específica que fue detectable en el lavado intestinal y las muestras fecales de ratones inmunizados.

Según su papel principal en la inducción de sIgA, las placas de Peyer (PP) tienen un epitelio asociado con folículos que contienen células M. Estos están especializados en la captura de antígenos (Neutra y cols., 2001) y están involucrados en que *rL.lactis*-SIP cruce la barrera intestinal después de la inmunización oral en un modelo murino (Hays y cols., 2019). Debido a sus dimensiones, *L. lactis* puede ser capturado fácilmente por las células

M, que contienen una población variada de linfocitos, macrófagos y DC, que a su vez organizan la respuesta de IgA en las PP (Ouweland y cols., 2002; Coombes y Powrie., 2008).

Las células dendríticas residentes (DC) en el intestino son una parte integral del sistema inmune de la mucosa y juegan un papel clave en la regulación de la defensa del huésped y la tolerancia inmune a una multitud de antígenos entéricos (Treg) (Ruane y Lavelle, 2011).

En ratones, las DC CD103 + de la lámina propia podrían migrar a los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN) para iniciar la respuesta inmune (Schulz y cols., 2009). Se han identificado como un subconjunto de DC caracterizadas por CD11c + y CD11b + en la lámina propia que podrían inducir células Th1 y Th17 específicas de antígeno, contribuyendo así a la diferenciación de células B vírgenes en IgA (Uematsu y cols., 2008).

En este contexto, la inmunización oral con r*L.lactis*-SIP aumentó el porcentaje de DC MHC-II + CD103 + CD11b + y MHC-II + CD103 + CD11c + en el intestino delgado, junto con un aumento de sIgA. Esto sugiere que la inmunización intestinal podría inducir la activación de las células Th1 y Th17 y contribuir potencialmente a la diferenciación de las células B en células plasmáticas IgA.

Existen varias estrategias alternativas para prevenir o limitar la colonización materna por SGB en lugar del actual IAP o los candidatos a vacunas propuestos. Las estrategias alternativas exploran la tendencia creciente de los agentes probióticos para limitar el crecimiento excesivo de patógenos mientras promueven una flora vaginal nativa saludable. Múltiples estudios han documentado la actividad inhibitoria de los lactobacilos en el crecimiento de SGB in vitro. La contribución de *L. lactis* al crecimiento de SGB no se ha dilucidado totalmente. Sin embargo, SGB es inherentemente resistente a la actividad antimicrobiana de la nisina, un antibiótico producido por *L. lactis*, a través de una enzima

que degrada la nisina (SaNSR). En este sentido, el uso de nisina en este estudio como inductor de la secreción de rSIP por *L. lactis* no contribuiría a disminuir la colonización vaginal por SGB.

Anteriormente, Gupalova y cols. (2018) desarrollaron una vacuna viva basada en la proteína Bac de los serotipos Ia, Ib, II, V y IX de SGB. Utilizaron la cepa probiótica *Enterococcus faecium* L3 para la inmunización de la mucosa. Una ventaja de este método es el aumento de la cantidad de antígeno por la cepa probiótica debido a su capacidad de multiplicarse a nivel de la mucosa. Sin embargo, es necesario considerar la generación de tolerancia inmunológica por estimulación antigénica constante.

En contraste, *L. lactis* es una bacteria no invasiva y no patógena con un estado de grado alimenticio GRAS (Bermúdez-Humarán y cols., 2011). Por lo tanto, se puede utilizar para el desarrollo de vacunas vivas sin riesgo de colonización y, por lo tanto, reducir el riesgo de generar tolerancia. Además, su pared de peptidoglicano es un adyuvante natural (Medina y cols., 2010). En este contexto, observamos una disminución significativa en la colonización por SGB en el tracto genitourinario de ratones inmunizados con *L. lactis*, lo que sugiere características adyuvantes en la disminución de la colonización vaginal por SGB. Las propiedades intrínsecas de los adyuvantes se han descrito previamente para la estimulación de una respuesta inmune específica contra los antígenos de otros patógenos (Medina y cols., 2010).

Estos resultados indican que las vacunas vivas orales usan *rL.lactis*-SIP como vector de expresión representa una alternativa segura, asequible y fácil de administrar para proteger contra la infección por SGB. Los anticuerpos séricos contribuyen significativamente a la defensa de la mucosa, principalmente debido a su actividad opsonofagocítica. Además, la respuesta humoral sérica específica contra SIP podría prevenir la propagación sistémica de

SGB. Es importante recalcar que una vacuna oral tiene una posibilidad de generar tolerancia oral, el cual es un estado de falta de respuesta sistémica que es la respuesta predeterminada a los antígenos alimentarios en el tracto gastrointestinal (Tordesillas y Berin, 2018). Los antígenos pueden ser adquiridos directamente por los fagocitos intestinales o pasar a través de los enterocitos o los conductos asociados a las células caliciformes antes de la captura por DC en la lámina propia (Tordesillas y Berin, 2018). En este contexto, el papel de las células T en la mediación de la tolerancia oral es inducido por los antígenos específicos de antígeno CD4 + CD25 + Foxp3 + Tregs (uno de los grandes mediadores de la tolerancia ). Este prototipo de vacuna no genera tolerancia oral debido a que no se encontró activación de linfocitos T reguladores, lo que sustenta aún más el uso de este prototipo como vacuna contra la infección de SGB.

La activación de linfocitos B dependiente de células T es un proceso mediante el cual una célula B se activa de manera óptima por una célula T helper que responde al mismo antígeno o una vacuna asociada físicamente (Morse y cols., 2012). Esta activación T dependiente es una razón bien conocida para diseñar vacunas que usan antígenos de polisacárido capsular, que son poco antigénicos por sí solos (Morse y cols., 2012). Nuestros resultados sugieren que SIP puede ayudar a las células T a producir IgG específica de SIP a través de la activación T dependiente. Es importante destacar que la secreción de anticuerpos anti-SIP a los 21 días después de la colonización de ratones receptores que recibieron células T CD4 + de ratones inmunizados con r*L.lactis*-SIP son funcionales según el ensayo OPA. Esta respuesta podría ser contribuida por la capacidad de SIP para activar el TLR2 y TLR4 (Diaz-Dinamarca y cols., 2020).

Si bien los resultados obtenidos permitieron caracterizar de manera exitosa la respuesta inmune celular T, el diseño experimental abarcaba mas experimentos para caracterizar en

específico el tipo de respuesta CD4 específica, se incluía en el diseño de factores de transcripción los marcadores T-bet, GATA-3 y RORyT para definir el tipo de respuesta observada, ya sea Th1, Th2 o Th17. El uso de los factores STAT3 y STAT5 permitían confirmar este fenotipo en una primera instancia. Además de los factores de transcripción se tenía en consideración la cuantificación de citoquinas en el sobrenadante de esplenocitos activados con SIP para obtener resultados similares a lo observado por los factores de transcripción maestros indicados anteriormente. Sin embargo, esto no fue posible debido a que la estimulación de los esplenocitos *invitro* con la proteína SIP fue deficiente debido a la poca cantidad de células sembradas para dicho objetivo, las cuales también fueron utilizadas para los factores de transcripción y la cantidad no fue suficiente para observar diferencias en ellos mediante qRT-PCR.

Un aspecto pendiente es cómo las células CD8 + pueden contribuir a la disminución de la colonización. Un posible mecanismo podría involucrar la inducción de linfocitos T citotóxicos (CTL) que matan bacterias extracelulares, presumiblemente por granulinas y granzimas (Dotiwala y Lieberman, 2019). Por otro lado, debido a que SIP es un agonista de TLR2 y TLR4, no queda claro si *rL.lactis* que secreta SIP regula la microbiota intestinal. Podría estar involucrado en la expresión de factores antimicrobianos como Reg3 $\gamma$ , contribuyendo así a la inhibición de bacterias patógenas (Rossi y cols., 2011).

En base a todos los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se puede decir que el prototipo de vacuna contra la infección intravaginal de SGB, es un buen prototipo por ser capaz de activar tanto la inmunidad humoral como celular, además los anticuerpos generados por la vacuna son opsonofagocíticos, el cual es el estándar para definir inmunidad protectora contra SGB. No solo la vacuna induce una respuesta inmune, sino

además evita la generación de linfocitos T reguladores, evitando así la tolerancia inmunogénica característica de esta vía de administración.

## Conclusiones

- El prototipo de vacuna basada en *rL.lactis*-SIP disminuye la colonización de SGB en el tracto genitourinario.
- El prototipo de vacuna basada en *rL.lactis*-SIP disminuye la colonización de SGB en el tracto genitourinario
- La vacuna genera inmunidad de tipo humoral, mediado por anticuerpos del tipo IgG e IgA.
- La vacuna induce inmunidad celular asociada a la activación de linfocitos T CD4 y CD8.
- La vacuna estimula una inmunidad protectora, mediada por anticuerpos con capacidad opsofagocítica.



## Referencias

Areschoug, T., Stålhammar-Carlemalm, M., Larsson, C., & Lindahl, G. (1999). Group B streptococcal surface proteins as targets for protective antibodies: identification of two novel proteins in strains of serotype V. *Infection and immunity*, 67(12), 6350-6357.

Azizpour, M., Hosseini, S. D., Jafari, P., & Akbary, N. (2017). *Lactococcus lactis*: A new strategy for vaccination. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 9(4), 163.

Baker, C. J., & Barrett, F. F. (1974). Group B streptococcal infections in infants: the importance of the various serotypes. *Jama*, 230(8), 1158-1160.

Baker, C., Barret, F., Gordon R., Yow, M. (1973) Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: a study of 33 infants. *Journal of Pediatrics* 82, 724-729.

Berardi, A., Rossi, C., Guidotti, I., Zucchini, A., De Carlo, L., Ferrari, F., & GBS Prevention Working Group. (2014). Group B streptococci in milk and neonatal colonisation. *Archives of disease in childhood*, 99(4), 395-395.

Berlec, A., Škrlec, K., Kocjan, J., Olenic, M., & Štrukelj, B. (2018). Single plasmid systems for inducible dual protein expression and for CRISPR-Cas9/CRISPRi gene regulation in lactic acid bacterium *Lactococcus lactis*. *Scientific reports*, 8(1), 1009.

Bermúdez-Humarán, L. G., Cortes-Perez, N. G., Lefèvre, F., Guimarães, V., Rabot, S., Alcocer-Gonzalez, J. M., ... & Gruss, A. (2005). A novel mucosal vaccine based

on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *The Journal of Immunology*, 175(11), 7297-7302.

Bermúdez-Humarán, L. G., Kharrat, P., Chatel, J. M., & Langella, P. (2011, December). Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. In *Microbial cell factories* (Vol. 10, No. 1, p. S4). BioMed Central.

Brodeur, B., Boyer, M., Charlebois, I., Hamel, J., Couture, F., Rioux, C., Martin, D. (2000) Identification of Group B Streptococcal Sip Protein, Which Elicits Cross-Protective Immunity. *Infection and Immunity* 68, 5610-5618.

Cui, Z., Tristram, S., LaScolea, J., Kwiatkowski, T., Kopti, S., Ogra, P (1991) Induction of antibody response to *Chlamydia trachomatis* in the genital tract by oral immunization. *Infection and Immunity*, 1465-1469.

Chen, V., Avci, F., Kasper, D. (2013) A maternal vaccine against group B *Streptococcus*: Past, present, and future. *Vaccine* 31S, 13-19.

Choi, M. J., Noh, J. Y., Cheong, H. J., Kim, W. J., Lin, S. M., Zhi, Y., ... & Song, J. Y. (2018). Development of a multiplexed opsonophagocytic killing assay (MOPA) for group B *Streptococcus*. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 14(1), 67-73.

Ciucci, T., Vacchio, M. S., & Bosselut, R. (2017). A STAT3-dependent transcriptional circuitry inhibits cytotoxic gene expression in T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(50), 13236-13241.

Coombes, J. L., & Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature reviews immunology*, 8(6), 435-446.

Coria, L. M., Risso, G. S., Guaimas, F. F., Ferrero, M. C., Bruno, L., Pasquevich, K. A., & Cassataro, J. (2019). Oral co-administration of a bacterial protease inhibitor in the vaccine formulation increases antigen delivery at the intestinal epithelial barrier. *Journal of controlled release*, 293, 158-171.

Dermer, P., Lee, C., Eggert, J., Few, B. (2004) A history of neonatal group B streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States. *Journal of Pediatrics Nursing* 19, 457-363.

Díaz-Dinamarca, D. A., Jerias, J. I., Soto, D.A., Soto, J. A., Díaz, N. V., Leyton, Y. Y., ... & Vásquez, A. E. (2018a). The Optimisation of the Expression of Recombinant Surface Immunogenic Protein of Group B Streptococcus in Escherichia coli by Response Surface Methodology Improves Humoral Immunity. *Molecular biotechnology*., 60(3), 215-225.

Diaz-Dinamarca, D. A., Soto, D. A., Leyton, Y. Y., Altamirano-Lagos, M. J., Avendaño, M. J., Kalergis, A. M., & Vasquez, A. E. (2018b). Oral vaccine based on a surface immunogenic protein mixed with alum promotes a decrease in Streptococcus agalactiae vaginal colonization in a mouse model. *Molecular immunology*, 103, 63-70.

Diaz-Dinamarca, D. A., Manzo, R. A., Soto, D. A., Avendaño-Valenzuela, M. J., Bastias, D. N., Soto, P. I., ... & Wilson, C. A. (2020). Surface Immunogenic Protein of Streptococcus Group B is an Agonist of Toll-Like Receptors 2 and 4 and a Potential Immune Adjuvant. *Vaccines*, 8(1), 29.

Doro, F., Liberatori, S., Rodríguez-Ortega, M. J., Rinaudo, C. D., Rosini, R., Mora, M., ... & Margarit, I. (2009). Surfome analysis as a fast track to vaccine discovery:

identification of a novel protective antigen for Group B Streptococcus hypervirulent strain COH1. *Molecular & cellular proteomics*, 8(7), 1728-1737.

Dotiwala, F.; Lieberman, J. Granulysin: Killer lymphocyte safeguard against microbes. *Curr. Opin. Immunol.* 2019, 60, 19–29.

Edwards, M., Nizet, V., Baker, C. (2011) Group B Streptococcal infections. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant 7th Edition*. 419-469.

Flores, A. R., Galloway-Peña, J., Sahasrabhojane, P., Saldaña, M., Yao, H., Su, X., ... & Ros, I. M. Y. (2015). Sequence type 1 group B Streptococcus, an emerging cause of invasive disease in adults, evolves by small genetic changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(20), 6431-6436.

Fluegge, K., Siedler, A., Heinrich, B. Schulte-Moenting, M., Bartels, D. (2006) Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. *Pediatrics* 117, 1139-1145.

Giorgakoudi, K., O'Sullivan, C., Heath, P. T., Ladhani, S., Lamagni, T., Ramsay, M., ... & Trotter, C. (2018). Cost-effectiveness analysis of maternal immunisation against group B Streptococcus (GBS) disease: A modelling study. *Vaccine*, 36(46), 7033-7042.

Gourlay, L. J., Santi, I., Pezzicoli, A., Grandi, G., Soriani, M., & Bolognesi, M. (2009). Group B streptococcus pullulanase crystal structures in the context of a novel strategy for vaccine development. *Journal of bacteriology*, 191(11), 3544-3552.

Gupalova, T., Leontieva, G., Kramskaya, T., Grabovskaya, K., Bormotova, E., Korjevski, D., & Suvorov, A. (2018). Development of experimental GBS vaccine for mucosal immunization. *PloS one*, 13(5).

Guzmán, A., Abarzúa, F., Belmar, C., García, P. (2001) Resultados de la aplicación del protocolo basado en Screening para la búsqueda de *Streptococcus agalactiae* en el tercer trimestre del embarazo: Posible impacto sobre la sepsis neonatal precoz por este agente. *Revista Chilena de Infectología* 18, 187-192

Hall, J., Adams, N. H., Bartlett, L., Seale, A. C., Lamagni, T., Bianchi-Jassir, F., ... & Ip, M. (2017). Maternal disease with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clinical infectious diseases*, 65(suppl\_2), S112-S124.

Hays, C., Touak, G., Bouaboud, A., Fouet, A., Guignot, J., Poyart, C., & Tazi, A. (2019). Perinatal hormones favor CC17 group B *Streptococcus* intestinal translocation through M cells and hypervirulence in neonates. *eLife*, 8.

Hickey, D., Aldwell, F., Beagley, K. (2010) Oral immunization with a novel lipid-based adjuvant protects against genital *Chlamydia* infection. *Vaccine* 28, 1668-1672.

Holmgren, J., Czerkinsky, C. (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nature medicine* 11, 45-53.

Instituto de Salud Pública de Chile. (2019) Vigilancia de laboratorio enfermedad invasora *Streptococcus agalactiae*, Chile 2014 – 2018. Vol 9. Chile. Instituto de Salud Pública.

Jiang, B., Li, Z., Ou, B., Duan, Q., & Zhu, G. (2019). Targeting ideal oral vaccine vectors based on probiotics: a systematical view. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(10), 3941-3953.

Johri, A. K., Paoletti, L. C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P. K., Grandi, G., & Rappuoli, R. (2006). Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. *Nature Reviews Microbiology*, 4(12), 932.

Kalliola, S., Vuopio-Varkila, J., Takala, A., Eskola, J. (1999) Neonatal group B streptococcal disease in Finland: a ten-year nationwide study. *Pediatrics Infectious Diseases J* 18, 806-810.

Klijin, N., Weerkamp, A. H., & de Vos, W. M. (1995). Genetic marking of *Lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*., 61(7), 2771–2774.

Kuipers OP, de Ruyter PGG, Kleerebezem M, de Vos WM (1998) Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *J Biotechnol* 64,15–21

Lancefield R., Hare, R. (1935) The serological differentiation of pathogenic and nonpathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *Journal of Experimental Medicine* 61, 335-349.

Lawn, J. E., Bianchi-Jassir, F., Russell, N. J., Kohli-Lynch, M., Tann, C. J., Hall, J., ... & Gravett, M. G. (2017). Group B streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children: why, what, and how to undertake estimates?. *Clinical infectious diseases*, 65(suppl\_2), S89-S99.

Le Doare, K., Heath, P. (2013) An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* 31S, 7-12.

Lin, S. M., Zhi, Y., Ahn, K. B., Lim, S., & Seo, H. S. (2018). Status of group B streptococcal vaccine development. *Clinical and experimental vaccine research*, 7(1), 76-81.

Ma, C., Zhang, L., Gao, M., & Ma, D. (2017). Construction of *Lactococcus lactis* expressing secreted and anchored *Eimeria tenella* 3-1E protein and comparison of protective immunity against homologous challenge. *Experimental parasitology*, 178, 14-20.

Macpherson, A. J., McCoy, K. D., Johansen, F. E., & Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal immunology*, 1(1), 11-22.

Madhi, S. A., Dangor, Z., Heath, P. T., Schrag, S., Izu, A., Sobanjo-ter Meulen, A., & Dull, P. M. (2013). 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*, 31, D52-D57.

Manning, S. D., Ki, M., Marrs, C. F., Kugeler, K. J., Borchardt, S. M., Baker, C. J., & Foxman, B. (2006a). The frequency of genes encoding three putative group B streptococcal virulence factors among invasive and colonizing isolates. *BMC infectious diseases*, 6(1), 116.

Manning, S., Wood, S., Kasha, K., Martin, D., Rioux, S., Brodeur, B., Davies, H. (2006b) Naturally occurring antibodies for the group B streptococcal surface

immunogenic protein (Sip) in pregnant women and newborn babies. *Vaccine* 24, 6905-6912.

Medina, M.S.; Vintiñi, E.O.; Villena, J.; Raya, R.R.; Alvarez, S.G. *Lactococcus lactis* as an adjuvant and delivery vehicle of antigens against pneumococcal respiratory infections. *Bioeng. Bugs* 2010, 1, 313–325

Melin, P., Efstratiou, A. (2013) Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. *Vaccine* 31S, 31-42.

Minervax [Internet] Copenhagen: Minervax; 2017. Available from: <http://minervax.com/news/2017/1/5/minervax-announces-positive-data-from-phase-i-clinical-trial.html>.

MINSAL. (2015). *Guia Perinatal* (1st ed.). Santiago.

Miquel-Clopés, A., Bentley, E. G., Stewart, J. P., & Carding, S. R. (2019). Mucosal vaccines and technology. *Clinical & Experimental Immunology*.

Mohseni, A. H., Taghinezhad-S, S., & Keyvani, H. (2020). The first clinical use of a recombinant *Lactococcus lactis* expressing human papillomavirus type 16 E7 oncogene oral vaccine: A phase I safety and immunogenicity trial in healthy women volunteers. *Molecular Cancer Therapeutics*, 19(2), 717-727.

Morse, K.; Norimine, J.; Palmer, G.H.; Suttén, E.L.; Baszler, T.V.; Brown, W.C. Association and evidence for linked recognition of type IV secretion system proteins VirB9-1, VirB9-2, and VirB10 in *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 2012, 80, 215–227



Neutra, M. R., Mantis, N. J., & Kraehenbuhl, J. P. (2001). Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature immunology*, 2(11), 1004-1009.

Neto, M. (2008) Group B streptococcal disease in Portuguese infants younger than 90 days. *Archives of Disease in Childhood. Fetal Neonatal Edition Journal* 93, 90-93.

Nocard, N., Mollereau, R. (1887) Sur une mammite contagieuse des vaches laitieres. *Annales Institute Pasteur* 1, 109-126.

Norton, P. M., Brown, H. W. G., & Le Page, R. W. F. (1994). The immune response to *Lactococcus lactis*: implications for its use as a vaccine delivery vehicle. *FEMS microbiology letters*, 120(3), 249-256.

Nuccitelli, A., Cozzi, R., Gourlay, L. J., Donnarumma, D., Necchi, F., Norais, N., ... & Grandi, G. (2011). Structure-based approach to rationally design a chimeric protein for an effective vaccine against Group B *Streptococcus* infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), 10278-10283.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. In *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications* (pp. 279-289). Springer, Dordrecht.

Rioux, S., Martin, D., Ackermann, H., Dumont, J., Hamel, J., Brodeur, BR. (2001) Localization of Surface Immunogenic Protein on Group B *Streptococcus*. *Infection and Immunity* 8, 5162- 5165.

Romero-Saavedra, F., Laverde, D., Budin-Verneuil, A., Muller, C., Bernay, B., Benachour, A., ... & Huebner, J. (2015). Characterization of two metal binding lipoproteins as vaccine candidates for enterococcal infections. *PLoS One*, 10(8).

Rossi, O.; van Baarlen, P.; Wells, J.M. Host-recognition of pathogens and commensals in the mammalian intestine. *Curr. Top. Microbiol.* 2011, 358, 291–321.

Ruane, D. T., & Lavelle, E. C. (2011). The role of CD103+ dendritic cells in the intestinal mucosal immune system. *Frontiers in immunology*, 2, 25.

Russell, N. J., Seale, A. C., O'Driscoll, M., O'Sullivan, C., Bianchi-Jassir, F., Gonzalez-Guarin, J., ... & Gravett, M. G. (2017). Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. *Clinical infectious diseases*, 65(suppl\_2), S100-S111.

Schrag, S., Verani, J. (2013) Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: Experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. *Vaccine* 31S, 20-26.

Schulz, O.; Jaensson, E.; Persson, E.K.; Liu, X.; Worbs, T.; Agace, W.W.; Pabst, O. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J. Exp. Med.* 2009, 206, 3101–3114.

Seale, A. C., Bianchi-Jassir, F., Russell, N. J., Kohli-Lynch, M., Tann, C. J., Hall, J., ... & Bartlett, L. (2017). Estimates of the burden of group B streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children. *Clinical Infectious Diseases*, 65(suppl\_2), S200-S219.

Soto, D. A., Altamirano, M. J., Díaz-Dinamarca, D. A., Leyton, Y. Y., Fernández, J. O., Lagos, J. W., ... & Vásquez, A. E. (2018). Desarrollo de un modelo murino de colonización vaginal de *Streptococcus agalactiae* utilizando una cepa chilena aislada de un recién nacido con septicemia. *Revista del Instituto de Salud Pública de Chile*, 2(1).

Soto, J.A., Diaz-Dinamarca D.A., Soto D.A., Barrientos M.J, Carrion F., Kalergis A.; Vasquez A.(2019). Cellular immune response induced by Surface Immunogenic Protein with AbISCO-100 adjuvant vaccination decreases Group B *Streptococcus* vaginal colonization. *Molecular Immunology*. 10.1016/j.molimm.2019.04.025

Soto, MJ., Valenzuela, I., Vasquez, A., Illanes, S. (2013) Prevention of Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Disease. *Reviews in Obstetrics and Gynecology* 6, 63-68.

Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K. M., Remaut, E., Le Page, R. W., & Wells, J. M. (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infection and immunity*, 66(7), 3183-3189.

Steinhoff, M. (2013) Assessments of vaccines for prenatal immunization. *Vaccine* 31S, 27- 30.

Stokes, C. R., Soothill, J. F., & Turner, M. W. (1975). Immune exclusion is a function of IgA. *Nature*, 255(5511), 745-746.

Teatero, S., Ferrieri, P., Martin, I., Demczuk, W., McGeer, A., & Fittipaldi, N. (2017). Serotype distribution, population structure, and antimicrobial resistance of group B Streptococcus strains recovered from colonized pregnant women. *Journal of clinical microbiology*, 55(2), 412-422.

Tordesillas, L., & Berin, M. C. (2018). Mechanisms of oral tolerance. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 55(2), 107-117.

Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B. G., Jung, Y. J., Nishiyama, M., ... & Kiyono, H. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature immunology*, 9(7), 769.

Verani JR, McGee L, Schrag SJ. Prevention of perinatal group B streptococcal disease: Revised guidelines from CDC. 2010. PMID: 21088663

Wells, J. M., Robinson, K., Chamberlain, L. M., Schofield, K. M., & Le Page, R. W. F. (1996). Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 317-330.

Whidbey, C., Harrell, M., Burnside, K., Ngo, L., Becraft, A., Iyer, L., Arabind, L., Hitti, J., Adams, K., Rajagopal, L. (2013) A hemolytic pigment of Group B Streptococcus allow bacterial penetration of human placenta. *The Journal of Experimental Medicine* 10, 1265- 1281.

World Health Organization. (2017) Group B Streptococcus Vaccine Development Technology. Geneva