

MILENE TAVARES BATISTA

**Uma nova estratégia vacinal para o controle da cárie baseada em
linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis***

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

São Paulo
2012

MILENE TAVARES BATISTA

**Uma nova estratégia vacinal para o controle da cárie baseada em
linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia
Café Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de
Souza Ferreira

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Batista, Milene Tavares.

Uma nova estratégia vacinal para o controle da cárie baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis* / Milene Tavares Batista. - São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microbiologia Aplicada.

Versão do título para o inglês: A new vaccine approach for the control of tooth decay based on recombinant *Bacillus subtilis* strains.

1. *Bacillus subtilis* 2. *Streptococcus mutans* 3. Esporos
4. Cárie dental 5. Proteínas heterólogas 6. Veículo vacinal I.
Ferreira, Profa. Dra. Rita de Cassia Café II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0197/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Milene Tavares Batista.

Título da Tese: Uma nova estratégia vacinal para o controle da cárie baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis*.

Orientador(a): Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

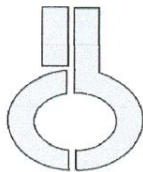
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

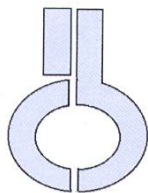
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **013** nas fls. **42** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Rita de Cássia Café Ferreira** Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Uma nova estratégia vacinal para o controle de cárie baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis***" do qual participou(aram) o(s) alunos **Milene Tavares Batista, Bruna Motta da Silva, Juliano Domirace Paccez, Roberto Nepomuceno de Souza Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em 27.02.2007.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2007.

Prof. Dr. CARLOS PELLESCI TABORDA
Vice - Coordenador da
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária da
CEEA - ICB/USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.12 .10

WTL/mcgn

São Paulo, 15 de março de 2010.

REF.: Protocolo nº13/07.

"Uma nova estratégia vacinal para o controle de cárie baseada em linhagens recombinantes de Bacillus subtilis"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 27.02.2013.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilma.Sra.

Profa Dra. RITA DE CÁSSIA CAFÉ FERREIRA

Departamento de Microbiologia

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Aos meus pais,
Ana e Adilao

Aos meus irmãos,
Michael e Marcel

Ao meu marido e eterno amor,
Leandro

Muito obrigada pelo amor, dedicação, apoio e
compreensão ao longo destes anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e à Nossa Senhora por me permitir concluir mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, Ana e Adilao, que são a razão da minha vida. Obrigada por me darem uma família linda, por me ensinarem os valores da vida e por sempre estarem ao meu lado. Mãe, obrigada por ser meu exemplo de grandiosidade de coração, por sua alegria, companheirismo, fé e amor incondicional. Pai, obrigada por ser meu exemplo de homem, de trabalhador, pai, por me ensinar o que é boa música, e por cuidar de mim como sua princesinha.

Aos meus irmãos, Michael e Marcel, por serem meus eternos “comparsas”, por me apoiarem sempre, me ajudarem quando ninguém mais podia.

Ao meu “namorido”, Leandro, por ser tão doce, amável, companheiro, por me entender e apoiar, por me ajudar a dar risada quando o que eu mais queria era chorar. E por ser meu eterno namorado, marido, amigo e amor.

Aos meus avôs pelo amor, carinho e cuidado.

À minha tia Edna por ser minha segunda mãe, cuidar de mim e me amar acima de tudo. E a minha priminha-irmã, Jéssica, pelas suas eternas estripulias e alegria.

As minhas cunhadas, Vanessa e Vanessa, que são parte da família e trazem ainda mais amor e união a nossa casa.

À Profa. Rita, minha orientadora, por ser minha eterna mestra e amiga, por me dar a oportunidade de conhecer a ciência, por me apoiar sempre, me ensinar e guiar pelo caminho profissional e pessoal (muitas vezes!). Obrigada pelo seu carinho e alegria!

Ao Prof. Luís, meu co-orientador, por ser um exemplo de dedicação, pesquisador e pessoa, pelos ensinamentos e paciência no trabalho, por seus bate-papos alegres e incentivadores.

Ao Prof. Wolfgang pelo seu carinho e cuidado em um tempo de incertezas.

À Profa Jeannine, um exemplo de pessoa e profissional, por me receber com carinho e atenção, pela oportunidade de crescer profissional e pessoalmente, por sua amizade.

À amiga e mestra Elisa, por ser um exemplo de força e amizade. Por me ajudar nos primeiros passos na ciência e ser meu ombro amigo, pelos incontáveis almoços e sorvetes, pela paciência em ouvir minhas preocupações e pelas risadas.

Aos amigos Luana, Bruno (Tintim) e Sabrina, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório, pela descontração e suporte.

Ao amigo de outrora que me iniciou no laboratório, muito obrigada!

Aos amigos “Bacileiros”, Wilson, Rafael, Renata e Juliano (ex-bacileiro) pelo trabalho em equipe, pela amizade. É um prazer trabalhar com pessoas como vocês.

À Renata pela sua ajuda profissional e pessoal, pelo carinho, por ter sempre aquele toque amigo, por ser minha “comparsa” de viagens nacionais e internacionais.

À amiga e companheira de noitadas no laboratório Camila Santos pela sua incansável energia, sua inteligência única, por sua maravilhosa força e amizade ao longo destes anos. Obrigada por construir comigo uma amizade linda e sincera.

Ao grupo do VTNC (Renata, Rafael e Cariri) que permitiram que eu me mantivesse sã em momentos turbulentos, pelas risadas e amizade.

Aos companheiros de laboratório (Carol IC, Ewerton, Mônica, Naína, Sara, Débora, Priscila, Raíza, Rubens, Jaime, Marcinha, Mariana IC, Juliana, Deni, Luana (e Manuzinha), Mari, Cariri e Bruna). Vocês estão no meu coração, obrigada pela amizade e coleguismo, colaborações e por momentos de alegria e baboseira.

Ao Eduardo, Loren e Lilian pela inestimável ajuda em tudo.

Ao Eduardo por seu profissionalismo, competência, amizade e por me aguentar pedindo coisas a toda hora.

Aos estagiários (Paschoal, Joelma, Bruno “Tintim”, Marianna, Mariela, Marilys e Gabriela) que me ensinaram muitas lições profissionais e de vida, pela ajuda e companheirismo.

À Maria Elizabete Almeida-Sbrogio (Bete) pelos ensinamentos, carinho e mimos ao longo destes anos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia pelo suporte em todos os momentos.

Aos funcionários e amigos do biotério da Parasitologia (Sandra, Juliane e Dani) pela competência, ajuda, ensinamentos e risadas.

As agências de fomento FAPESP, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro, sem o qual seria impossível realizar este trabalho.

A todos aqueles que não consegui agradecer, minha eterna gratidão.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.

Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

TAVARES, M. B. **Uma nova estratégia vacinal para o controle da cárie baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis***. 2012. 200 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é o agente etiológico da cárie dental humana, uma doença com ampla distribuição mundial. A adesão à superfície dental depende da interação entre a proteína de superfície P1 e a aglutinina salivar (SAG) adsorvida ao dente. A região N-terminal da P1 é um alvo vacinal importante que está diretamente associada às funções de adesão e agregação. Este trabalho teve o objetivo de avaliar estratégias vacinais contra o *S. mutans* baseadas na proteína P1 usando linhagens recombinantes de *B. subtilis*. O *B. subtilis* é uma bactéria gram positiva, formadora de esporos, não patogênica, empregada como sistema de expressão de proteínas heterólogas e como veículo vacinal administrado por vias de mucosas. Empregamos, inicialmente, o *B. subtilis* para expressar e purificar a proteína P1₃₉₋₅₁₂ derivada da proteína P1 de *S. mutans* UA159. O antígeno P1₃₉₋₅₁₂ apresentou epítomos lineares e conformacionais semelhantes aos presentes na proteína P1 nativa. O sítio de ligação à SAG está preservado nessa proteína assim como suas propriedades imunogênicas. A coadministração parenteral do antígeno com adjuvantes vacinais promoveu resposta sistêmica específica com anticorpos eficazes no bloqueio da adesão de *S. mutans*. Por fim, usamos esporos de *B. subtilis* como veículo de entrega de mucosa para o antígeno alvo de *S. mutans*. Esporos de *B. subtilis* foram modificados para expressar na superfície adesinas bacterianas (SfpA, InvA ou Inv600) com capacidade de ligação ao epitélio intestinal e, quando no estágio de célula vegetativa, expressar intracelularmente o antígeno P1₃₉₋₅₁₂. A imunização oral com os esporos adesivos induziu altas concentrações de anticorpos sistêmicos e de mucosa. A imunização nasal ou sublingual com os esporos recombinantes induziu níveis de anticorpos sistêmicos maiores do que aqueles obtidos após a imunização oral. Além disso, esses anticorpos foram mais eficientes em bloquear a adesão de *S. mutans* à SAG imobilizada, sem interferir com a agregação. Em conclusão, os resultados obtidos abrem perspectivas interessantes para o desenvolvimento de vacinas anti-cárie baseadas em linhagens de *B. subtilis*.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*. *Streptococcus mutans*. Vacina. Cárie dental. Proteínas heterólogas. Veículo vacinal. Esporos.

ABSTRACT

TAVARES, M. B. **A new vaccine approach for the control of tooth decay based on recombinant *Bacillus subtilis* strains.** 2012. 200 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

S. mutans is the major etiologic agent of human dental caries, a disease with worldwide distribution. The adhesion to the tooth surface is dependent on the interaction of the P1 surface protein and salivary agglutinin (SAG) adsorbed to the tooth. The N-terminal region of P1 is an important vaccine target that is directly associated with adhesion and aggregation functions. This study aimed to evaluate vaccination strategies against *S. mutans* based on the P1 protein using recombinant *B. subtilis* strains. *B. subtilis* is a gram positive, spore-forming, non-pathogenic bacterium used as expression system for heterologous proteins and as a vaccine vehicle administered by mucosal routes. Initially, we employed a recombinant *B. subtilis* strain to express and purify the P1₃₉₋₅₁₂ protein derived from the *S. mutans* UA159 P1 protein. The P1₃₉₋₅₁₂ antigen showed important conformational and linear epitopes similar to those present in the native P1 protein. The SAG-binding site is preserved in P1₃₉₋₅₁₂ as well as immunological properties. The parenteral co-administration of antigen with vaccine adjuvants stimulated systemic antibodies effective in blocking adhesion of *S. mutans* to SAG. Lastly, we used *B. subtilis* spores as a mucosal delivery vehicle for antigen targeting. *B. subtilis* endospores were modified to display bacterial adhesins (SlpA, InvA or Inv600), capable to bind to the intestinal epithelium, on the spore surface and to express intracellularly the P1₃₉₋₅₁₂ antigen during the vegetative cell stage. Oral immunization with adhesive spores induced high systemic and mucosal specific antibodies levels. The nasal or sublingual immunization with *B. subtilis* recombinant spores induced higher amounts of systemic antibodies than the oral immunization. Furthermore, the specific antibodies were highly effective in blocking the adherence of *S. mutans* to immobilized SAG, without interfering with aggregation. In conclusion, the results open interesting perspectives for the development of anti-caries vaccines based on *B. subtilis* strains.

Keywords: *Bacillus subtilis*. *Streptococcus mutans*. Vaccine. Dental caries. Heterologous proteins. Vaccine vehicle. Spores.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1- Representação esquemática da proteína P1 de <i>S. mutans</i> | 26 |
| Figura 2- Construção do vetor de expressão e purificação da proteína P1 ₃₉₋₅₁₂ em <i>B. subtilis</i> (pLDV701)..... | 71 |
| Figura 3- Detecção e purificação da proteína P1 ₃₉₋₅₁₂ produzida em linhagem recombinante de <i>B. subtilis</i> | 72 |
| Figura 4- Representação esquemática das proteínas recombinantes derivadas da proteína P1 de <i>S. mutans</i> e distribuição dos anticorpos monoclonais (mAbs) anti-P1 na estrutura conformacional da proteína. | 74 |
| Figura 5- Avaliação da reatividade dos mAbs anti-P1 com a proteína nativa expressa no <i>S. mutans</i> NG8 e com os fragmentos de proteína derivados da proteína P1. | 75 |
| Figura 6- Caracterização dos epítomos da proteína recombinante P1 ₃₉₋₅₁₂ usando anticorpos monoclonais anti-P1. | 76 |
| Figura 7- Interação da proteína P1 ₃₉₋₅₁₂ recombinante com a SAG usando BIAcore (surface plasmon resonance). | 78 |
| Figura 8- Especificidade antigênica dos anticorpos produzidos em camundongos imunizados com a proteína P1 ₃₉₋₅₁₂ | 81 |
| Figura 9- Reatividade dos soros gerados em camundongos com a proteína P1 ₃₉₋₅₁₂ purificada em linhagem recombinante de <i>B. subtilis</i> LDV701. | 83 |
| Figura 10- Determinação da funcionalidade <i>in vitro</i> dos anticorpos gerados em camundongos com as proteínas P1 ₃₉₋₅₁₂ ou P1 _{39-512d} | 86 |
| Figura 11- Avaliação da resposta imunológica sistêmica em camundongos imunizados pela via subcutânea com a proteína P1 ₃₉₋₅₁₂ associada aos diferentes adjuvantes. | 89 |

| | |
|---|-----|
| Figura 12- Determinação da avidéz dos anticorpos em relação ao antígeno vacinal P1 ₃₉₋₅₁₂ | 91 |
| Figura 13- Reatividade dos soros com a proteína P1 nativa de <i>S. mutans</i> NG8 e os fragmentos truncados da P1. | 93 |
| Figura 14- Deposição do complemento na superfície de <i>S. mutans</i> na presença de anticorpos anti-P1 ₃₉₋₅₁₂ | 95 |
| Figura 15- Funcionalidade dos soros gerados após imunização da proteína P1 ₃₉₋₅₁₂ co-administrada com diferentes adjuvantes. | 97 |
| Figura 16- Representação esquemática do direcionamento dos esporos de <i>B. subtilis</i> para células imunes de mucosa no GALT (<i>gastrointestinal-associated lymphoid tissue</i>) e consequência para a resposta imunológica ao antígeno alvo. | 107 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Linhagens empregadas e construídas neste trabalho..... | 42 |
| Quadro 2 - Vetores empregados e construídos neste trabalho..... | 43 |
| Quadro 3 - Iniciadores desenhados para a amplificação dos genes de interesse..... | 47 |
| Quadro 4- Reatividade dos anticorpos policlonais com as proteínas recombinantes P1, P1 ₃₉₋₅₁₂ ou P1 _{39-512d} | 82 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 21 |
| 1.1 A cárie dental humana | 21 |
| 1.2 <i>Streptococcus mutans</i> | 22 |
| 1.3 A família do Antígeno I/II e a Proteína P1 de <i>S. mutans</i> | 23 |
| 1.4 Região A ou Região de ligação à saliva | 27 |
| 1.5 Estratégias vacinais contra a cárie dental | 28 |
| 1.6 <i>Bacillus subtilis</i> e o desenvolvimento de vacinas | 32 |
| 1.7 Vacinas de mucosa baseadas em <i>B. subtilis</i> | 37 |
| 2 OBJETIVOS | 39 |
| 2.1 Objetivo geral | 39 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 39 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 40 |
| 3.1 Linhagens e vetores bacterianos, condições de cultivo | 40 |
| 3.2 Competência e transformação em <i>E. coli</i> | 40 |
| 3.3 Competência e transformação em <i>B. subtilis</i> | 41 |
| 3.4 Lise de células vegetativas de <i>B. subtilis</i> | 44 |
| 3.5 Extração de proteínas totais de <i>S. mutans</i> | 44 |
| 3.6 Indução e purificação da proteína CG14 a partir de <i>E. coli</i> | 44 |
| 3.7 Produção de anticorpos anti-P1 de <i>S. mutans</i> | 44 |
| 3.8 Construção do vetor de clonagem pGP1N..... | 45 |
| 3.8.1 Isolamento de DNA genômico de <i>S. mutans</i> | 45 |
| 3.8.2 Amplificação do gene <i>spaP1N</i> por reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonagem no vetor pGEM-T-easy..... | 45 |
| 3.9 Construção do vetor de expressão pLDV701 | 48 |

| | |
|--|----|
| 3.10 Expressão da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ em linhagem de <i>B. subtilis</i> LDV701 | 48 |
| 3.11 Fracionamento da amostra induzida de LDV701 | 49 |
| 3.12 Purificação da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ a partir de linhagem recombinante de <i>B. subtilis</i> | 50 |
| 3.13 SDS-PAGE e <i>Western blot</i> da proteína P1₃₉₋₅₁₂ | 50 |
| 3.14 Expressão e purificação dos fragmentos da proteína P1 | 50 |
| 3.15 Preparação dos anticorpos monoclonais (mAbs) anti-P1 | 50 |
| 3.16 Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-P1 com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ por meio de <i>Western blot</i> | 51 |
| 3.17 Determinação da reatividade dos mAbs anti-P1 com os fragmentos da proteína P1 e a proteína P1₃₉₋₅₁₂ por meio de ELISA | 51 |
| 3.18 Preparo da aglutinina salivar (SAG) | 52 |
| 3.19 Ensaio de ligação da P1₃₉₋₅₁₂ à SAG imobilizada em microchip via sistema BIAcore | 52 |
| 3.20 Regime vacinal e processamento das amostras | 53 |
| 3.21 Produção de anticorpos contra toda bactéria <i>S. mutans</i> | 53 |
| 3.22 Adsorção dos anticorpos IgG anti-P1 com as proteínas P1₃₉₋₅₁₂ e P1_{39-512d} ... | 54 |
| 3.23 ELISA para detecção de anticorpos específicos contra as proteínas P1, P1₃₉₋₅₁₂ e P1_{39-512d} | 54 |
| 3.24 Imunofluorescência do <i>S. mutans</i> | 55 |
| 3.25 Ensaio de inibição da agregação do <i>S. mutans</i> mediada por saliva livre por meio de anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ | 55 |
| 3.26 Bloqueio da adesão de <i>S. mutans</i> à SAG imobilizada por anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ em placa de microtitulação | 56 |
| 3.27 Imunogenicidade da proteína P1₃₉₋₅₁₂ em associação com diferentes adjuvantes - Protocolo vacinal | 57 |

| | |
|---|----|
| 3.28 Coleta de amostras | 57 |
| 3.29 ELISA para detecção de anticorpos específicos contra a proteína P1 ₃₉₋₅₁₂ | 58 |
| 3.30 ELISA de avidéz..... | 58 |
| 3.31 Reatividade dos soros policlonais anti-P1 ₃₉₋₅₁₂ com os fragmentos da proteína P1 por meio de ELISA | 59 |
| 3.32 Inibição da adesão de <i>S. mutans</i> ao SAG imobilizado por anticorpos anti- P1 ₃₉₋₅₁₂ específicos utilizando o sistema de BIAcore | 59 |
| 3.33 Inibição da agregação de <i>S. mutans</i> ao SAG livre por meio de espectrofotometria..... | 60 |
| 3.34 Ensaio de deposição da proteína C3 do complemento | 60 |
| 3.35 Construção das linhagens de <i>B. subtilis</i> capazes de expressar adesinas bacterianas na superfície dos esporos | 61 |
| 3.36 Construção do vetor vacinal pLDV702 de <i>B. subtilis</i> | 62 |
| 3.37 Preparo dos esporos de <i>B. subtilis</i> | 63 |
| 3.38 Extração e detecção das proteínas recombinantes da capa dos esporos..... | 63 |
| 3.39 Detecção e quantificação da expressão <i>in vitro</i> da P1 ₃₉₋₅₁₂ nas linhagens vacinais de <i>B. subtilis</i> | 64 |
| 3.40 Imunofluorescência dos esporos | 64 |
| 3.41 Adesão dos esporos recombinantes de <i>B. subtilis</i> a células Caco-2 <i>in vitro</i> . | 65 |
| 3.42 Disseminação dos esporos no intestino de camundongos | 66 |
| 3.43 Adesão dos esporos de <i>B. subtilis</i> às placas de Peyer de camundongos | 66 |
| 3.44 Regime vacinal com esporos recombinantes de <i>B. subtilis</i> e processamento das amostras | 67 |
| 3.45 Detecção das respostas antígeno-específicas de anticorpos séricos e de mucosa..... | 67 |
| 3.46 Inibição da agregação de <i>S. mutans</i> mediada pela SAG livre em placas de microtitulação..... | 68 |

| | |
|--|----|
| 3.47 Inibição da adesão de <i>S. mutans</i> mediada pelo SAG ligado em placa de microtitulação | 68 |
| 3.48 Análises estatísticas | 69 |
| 4 RESULTADOS | 70 |
| 4.1 Capítulo I. Produção e caracterização funcional e imunológica da proteína P1₃₉₋₅₁₂ produzida a partir de uma linhagem recombinante de <i>B. subtilis</i> | 70 |
| 4.1.1 Construção da linhagem recombinante de <i>B. subtilis</i> LDV701, expressão e purificação da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ | 70 |
| 4.1.2 Reatividade dos monoclonais (mAbs) anti-P1 com as proteínas P1, P1₃₉₋₅₁₂ e os domínios funcionais da P1 | 73 |
| 4.1.3 Ligação da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ produzida em <i>B. subtilis</i> LDV701 à SAG | 77 |
| 4.1.4 Avaliação das propriedades imunogênicas e antigênicas da P1₃₉₋₅₁₂ expressa em <i>B. subtilis</i> usando soros policlonais | 79 |
| 4.1.5 Inibição do processo de agregação e adesão dependente de saliva com anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ e anti-P1_{39-512d} | 84 |
| 4.2 Capítulo II. Caracterização imunológica de formulações vacinais usando a proteína P1₃₉₋₅₁₂ co-administrada com diferentes adjuvantes | 87 |
| 4.2.1 Avaliação da imunogenicidade da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ produzida em <i>B. subtilis</i> administrada com diferentes adjuvantes | 87 |
| 4.2.2 Caracterização dos soros gerados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada a adjuvantes quanto a sua avidéz pelo antígeno | 90 |
| 4.2.3 Avaliação da antigenicidade dos fragmentos de P1 usando os soros gerados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada aos adjuvantes | 92 |
| 4.2.4 Ativação da via clássica do complemento pelos soros policlonais gerados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada aos diferentes adjuvantes | 94 |
| 4.2.5 Funcionalidade <i>in vitro</i> dos soros gerados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada a adjuvantes em bloquear a adesão do <i>S. mutans</i> NG8 à SAG | 96 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.6 Inibição da agregação de <i>S. mutans</i> NG8 in vitro usando os soros policlonais gerados com os diferentes adjuvantes | 96 |
| 4.2.7 Discussão do Capítulo I e II | 98 |
| 4.3 Capítulo III. Desenvolvimento e caracterização dos esporos adesivos de <i>B. subtilis</i> como veículo vacinal de entrega de mucosa | 104 |
| 5 DISCUSSÃO FINAL | 147 |
| 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS | 151 |
| REFERÊNCIAS | 152 |
| APÊNDICE A - Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of <i>Streptococcus mutans</i> P1 protein produced by a recombinant <i>Bacillus subtilis</i> strain | 173 |
| APÊNDICE B - Avaliação da influência das condições de cultivo e método de purificação na recuperação de esporos de <i>B. subtilis</i> com alto grau de pureza e rendimento | 180 |
| APÊNDICE C - Súmula curricular | 196 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cárie dental humana

A saúde bucal é um componente substancial da saúde do ser humano. Entretanto, nos dias atuais diversas doenças orais crônicas, como a cárie dental, estão disseminadas em países industrializados e em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) qualifica a cárie dental como um dos maiores problemas de saúde pública, devido à alta prevalência no mundo. Atualmente, a doença acomete cerca de 90% das crianças em idade escolar e cerca de 100% da população mundial adulta (LEHNER, 1992; SHIVAKUMAR; VIDYA; GHANDU, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

A cárie dental é uma doença transmissível, crônica, não letal, caracterizada pela desmineralização do esmalte dental em consequência da produção de ácidos por bactérias fermentadoras presentes no biofilme dental (COTE et al., 2004; HAJISHENGALLIS; RUSSELL; MICHALEK, 1998; SMITH, 2012; TAKAHASHI; NYVAD, 2011; TAUBMAN; NASH, 2006). A doença cárie apresenta etiologia multifatorial com envolvimento da dieta e susceptibilidade do hospedeiro, microbiota e o tempo (FEJERSKOV, 2004; SHIVAKUMAR; VIDYA; GHANDU, 2009).

Mais de 700 espécies bacterianas estão presentes no biofilme dental e dentre estas duas espécies pertencentes ao gênero *Streptococcus* tem sido relacionadas como agentes etiológicos primários da cárie dental de superfície lisa, o *S. mutans* e o *S. sobrinus*, sendo o primeiro mais frequentemente isolado da cavidade oral de humanos e responsável por mais de 90% das lesões cariosas (DEWHIRST et al., 2010; HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986). Além disso, essa bactéria tem sido associada a doenças infecciosas não orais como a endocardite bacteriana (AJDIC et al., 2002; HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986).

Medidas como a administração tópica e sistêmica de flúor tiveram forte impacto sobre a incidência de cárie na população mundial, contudo a eficácia desses métodos não foi suficiente para erradicar a doença (HAJISHENGALLIS; MICHALEK 1999; KOGA et al., 2002; SHIVAKUMAR; VIDYA; GHANDU, 2009). Desta forma, o

desenvolvimento de medidas efetivas de saúde pública que controlem o patógeno mostra-se interessante pelo potencial impacto sobre a saúde bucal e geral do indivíduo.

1.2 *Streptococcus mutans*

O *S. mutans* é um coco, firmicute, imóvel, catalase negativo, facultativo, capaz de fermentar diversos açúcares provenientes da dieta do hospedeiro produzindo ácidos que reduzem o pH da placa dental e promovem a desmineralização do esmalte (HAMADA; SLADE, 1980; TAUBMAN; NASH, 2006). A infecção por *S. mutans* pode ocorrer em dois momentos ao longo da vida do indivíduo saudável, na erupção dos dentes decíduos e na troca para os dentes permanentes, estes períodos são denominados de “janelas de infectividade” (CAUFIELD; CUTTER; DASANAYAKE, 1993; SMITH, 2002).

A capacidade de aderir à superfície dental, a habilidade de metabolizar carboidratos e produzir ácidos (acidogenicidade), e a capacidade de suportar ambientes ácidos (aciduricidade) são os principais fatores de virulências do *S. mutans* relacionados com a doença cárie (HAMADA; KOGA; OOSHIMA, 1984; MICHALEK et al., 1981). A adesão é fundamental para a patogênese da cárie dental, pois na ausência desta não haverá formação do biofilme e desenvolvimento da doença. A aderência do *S. mutans* à superfície dental envolve dois estágios, o primeiro deles, denominado sacarose-independente e o segundo, sacarose-dependente (HAMADA; SLADE, 1980; STAAT; LANGLEY; DOYLE, 1980; TAUBMAN; NASH, 2006).

O primeiro estágio de adesão do *S. mutans* ao dente é reversível e caracterizado pela interação entre uma proteína de superfície da bactéria, o antígeno I/II ou P1, expresso por todas as linhagens cariogênicas de *S. mutans* e glicoproteínas presente na película adquirida adsorvida ao dente (BOWEN et al., 1991; CROWLEY et al., 1999; SMITH, 2002; STAAT; LANGLEY; DOYLE, 1980). O segundo estágio de adesão é irreversível e associado à produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis (glucanos) e posterior interação desses com as proteínas ligadoras de glucanos (Gbp) e glicosiltransferases (GtfB) presentes na superfície bacteriana. Este

estágio permite o acúmulo do *S. mutans* e o desenvolvimento do biofilme na superfície dental (BOWEN; KOO, 2011; HAMADA; KOGA, 1984; SHIROZA et al., 2003).

O *S. mutans* apresenta diferentes antígenos em sua superfície incluindo polissacarídeos antigênicos, as Gtfs, Gbp, antígeno D, antígeno III, antígeno A, antígeno C e antígeno B (P1). Entretanto, até momento apenas a proteína P1 e a GbpB tem mostrado potencial como alvos vacinais com resultados favoráveis para o controle da doença (BRADY et al., 2010; KOGA et al., 1995; KURAMITSU, 1993)

1.3 A família do Antígeno I/II e a Proteína P1 de *S. mutans*

Na cavidade oral a interação inicial entre bactéria e hospedeiro é dependente da associação entre adesinas de superfície bacteriana e receptores presentes na película adquirida adsorvida sobre o dente (HAMADA; SLADE, 1980).

Nos estreptococos orais do grupo Viridans, as proteínas da família I/II participam na aderência, colonização e desenvolvimento da comunidade microbiana. As proteínas da família I/II são adesinas ancoradas à parede celular bacteriana com estrutura e antigenicidade relacionadas e apresentam entre 1310 e 1653 resíduos de aminoácidos (BRADY et al., 2010). Essas proteínas possuem propriedades multifuncionais como ligação a matriz extracelular, a receptores do hospedeiro, co-agregação com outras bactérias, interação com glicoproteínas salivares e ativação de células monocíticas (JENKINSON; DEMUTH, 1997; JENKINSON; LAMONT, 1997; MADDOCKS et al., 2011). As proteínas da família I/II têm sido extensivamente caracterizadas em numerosas linhagens de *S. mutans* e *S. gordonii* e apresentam uma organização estrutural global altamente conservada com identidade entre 65 a 70% (DEMUTH et al., 1988, 1990; JENKINSON et al., 1993; KELLY et al., 1990; LEE; PROGULSKE-FOX; BLEIWEIS, 1988; OGIER et al., 1990; OKAHASHI et al., 1989; TOKUDA et al., 1991). A importância dessa família de proteínas pode ser demonstrada pela presença de ortólogos em virtualmente todos os estreptococos orais e a identificação destas também em *S. pyogenes* e *S. agalactiae* (MA et al., 1991; ZHANG et al., 2006).

A proteína P1 de *S. mutans*, também referida como Antígeno I/II, Antígeno B ou PAc, é o maior antígeno de superfície deste microrganismo e pertence a grande família I/II (JENKINSON; LAMONT, 1997; RUSSELL; LEHNER, 1978; KOGA et al., 1995). A proteína P1 em *S. mutans* está envolvida no complexo processo multifatorial de aderência as glicoproteínas salivares adsorvidas ao esmalte dentário (BOWEN et al., 1991). Na linhagem UA159 de *S. mutans* do sorotipo *c*, a proteína P1 com peso molecular aproximado de 171 kDa é codificada pelo gene *spaP* com 4689 pb (AJDIC et al., 2002).

A sequência primária da P1 de *S. mutans* apresenta seis regiões distintas: um peptídeo sinal predito composto pelos resíduos de aminoácido 1 até 38, adjacente a este está a porção N-terminal altamente carregada composta principalmente por uma região rica em alanina (região A, resíduos de aminoácidos 186-464). A região C-terminal inclui um segmento rico em prolina (região P, resíduos de aminoácidos 840-963) que confere uma alta hidrofobicidade a proteína, um domínio transmembrânico e o motivo LPXTG que permite a ancoragem proteica na parede celular bacteriana. Na região central, entre as regiões A e P, localiza-se um segmento denominado de variável (região V) onde reside a maior variabilidade de sequência da proteína P1 entre as cepas de *S. mutans* (BRADY et al., 1991, 1998; FISCHETTI; PANCHOLI; SCHNEEWIND, 1990; KELLY et al., 1989, 1995; MURAKAMI et al., 1997; THON-THAT; MARRAFFINI; SCHNEEWIND, 2004) (figura 1A).

Anterior à cristalografia da proteína P1 de *S. mutans* um conjunto de 11 anticorpos monoclonais (mAbs) anti-P1 de *S. mutans* foram usados como ferramentas para caracterizar os domínios funcionais da P1 assim como a antigenicidade desta ou de fragmentos truncados derivados da P1, permitindo a elucidação de algumas das propriedades mais importantes deste antígeno (BRADY et al., 1991, 1992; CROWLEY et al., 1993). Em 2002, Troffer-Charlier obtiveram a cristalografia da região V da proteína P1, permitindo a primeira observação sobre a estrutura 3D desta proteína de *S. mutans*. Em 2010 e 2011, o restante da estrutura cristalográfica da proteína P1 de *S. mutans* foi resolvida e mostrou ser singular. A proteína P1 de *S. mutans* apresenta uma estrutura fibrilar alongada de aproximadamente 50 nm, onde a região A forma

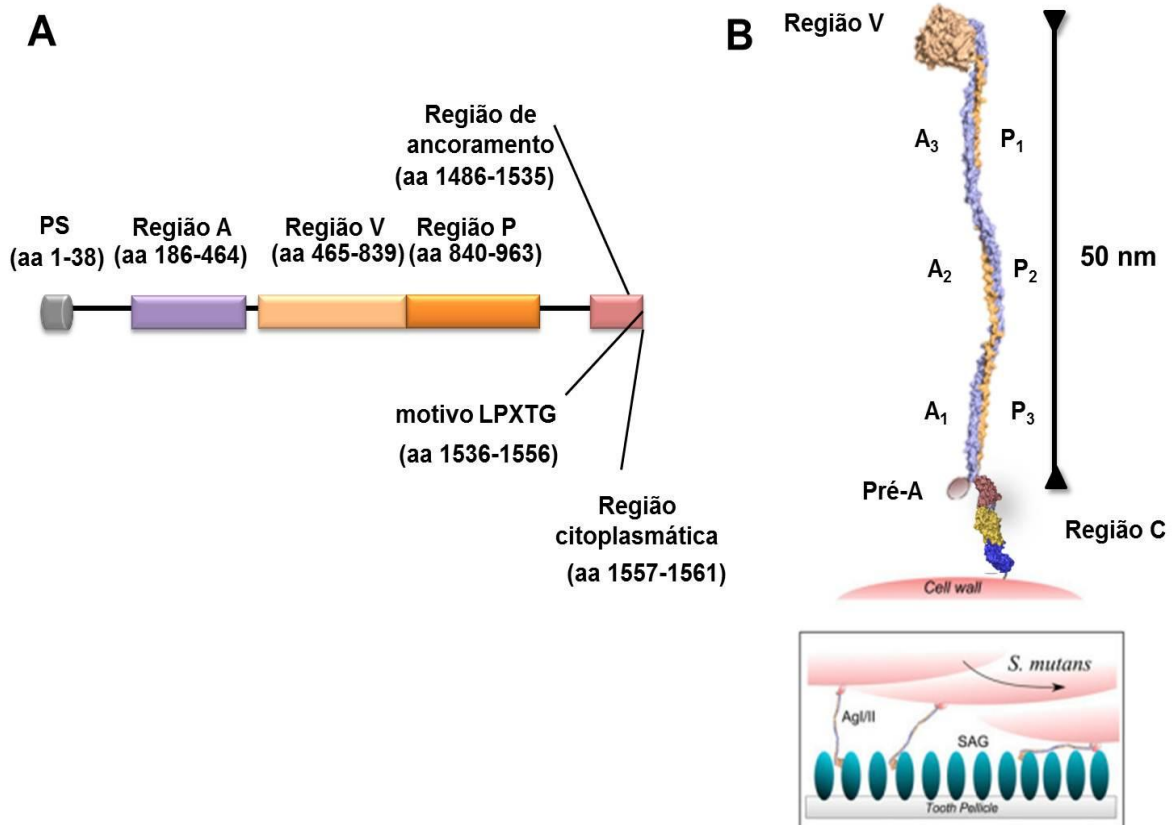
uma α -hélice que entrelaça intimamente a região P em hélice, enquanto a região V se dobra formando uma estrutura globular (LARSON et al., 2010, 2011) (figura 1B).

A deleção da proteína P1 em linhagens de *S. mutans* resulta em redução drástica da adesão à superfície dental na presença de saliva e de sua hidrofobicidade, indicando o papel desta proteína na colonização da cavidade oral pelo patógeno (BRADY et al., 1992; KOGA et al., 1990; LEE et al., 1989). A proteína P1 de *S. mutans* interage especificamente com o receptor de varredura da imunidade inata, a glicoproteína 340 (gp340), presente na aglutinina salivar (SAG) (LEITO et al., 2008). O SAG é uma proteína oligomérica complexa de massa molecular aproximada de 400 kDa composta pela gp340, imunoglobulina A secretada e uma proteína de 80 kDa (OHO et al., 1998; PRAKOBPHOL et al., 2000). A proteína P1 pode interagir com duas formas da gp340, livre ou ligada à superfície dental, e isso determinará o destino da bactéria na cavidade oral. Quando livre na saliva, a glicoproteína interage com a proteína P1 de superfície do *S. mutans* resultando em agregação e provavelmente eliminação da cavidade oral por meio da deglutição. Esse processo é importante na proteção inata contra a cárie dental e tem sido considerado um mecanismo não imune de eliminação do patógeno. Quando imobilizada, a glicoproteína servirá como um receptor para aderência do *S. mutans* ao dente com consequente estabelecimento do biofilme dental (LOIMARANTA et al., 2005; STENUDD et al., 2001). Entretanto, apesar de ambos os processos envolverem os mesmos constituintes (proteína P1 e gp340) dados sugerem que esses processos devem envolver domínios distintos das proteínas (BRADY et al., 1992).

Evidências prévias de que vários fragmentos derivados da proteína P1 eram capazes de interagir com a gp340 indicavam que essa proteína poderia apresentar múltiplos sítios de ligação à gp340 adsorvida (BRADY et al., 1992; KELLY et al., 1995; NAKAI et al., 1993). De fato, a proteína P1 de *S. mutans* apresenta pelo menos dois sítios de ligação à SAG, um sítio está localizado na região C-terminal, mais precisamente entre a região C1 e C2, e outro sítio está localizado dentro do fragmento A_3VP_1 , que corresponde a última região de repetição A, toda a região V e a primeira região de repetição P. Adicionalmente, foi demonstrado que esses fragmentos não

competem entre si pelo SAG indicando sítios distintos de ligação (LARSON et al., 2011) (figura 1B).

Figura 1- Representação esquemática da proteína P1 de *S. mutans*.



(A) Representação da sequência primária da P1 com seus domínios relevantes. (B) Modelo da estrutura terciária da proteína P1 e os sítios de ligação à aglutinina salivar humana (SAG). PS, peptídeo sinal.

Fonte: Modificado de Larson et al. (2010, 2011).

1.4 Região A ou Região de ligação à saliva

Na porção amino-terminal da proteína P1 do *S. mutans* está localizada uma região rica no aminoácido alanina, composta por três repetições de alanina completas e uma incompleta formando uma estrutura em α -hélice denominada de região A (KELLY et al., 1989; LARSON et al., 2010). Por afeição aos componentes salivares, a região A tem sido referida como região de ligação à saliva ou SBR (**S**aliva-**B**inding **R**egion) (CROWLEY et al., 1993; HAJISHENGALLIS; KOGA; RUSSELL, 1994; HAJISHENGALLIS; RUSSELL; MICHALEK, 1998; NAKAI et al., 1993).

A região SBR codifica para uma proteína de peso molecular aproximado de 42 kDa, a qual permite a interação de *S. mutans* com componentes salivares, particularmente a proteína gp340, demonstrando sua importância para aderência inicial do patógeno à saliva adsorvida ao dente e subsequente desenvolvimento da cárie (CROWLEY et al., 1993; HAJISHENGALLIS; RUSSELL; MICHALEK, 1998; KOGA; RUSSELL, 1994; MOISSET et al., 1994; PRAKOBPHOL et al., 2000). Esse segmento da P1 inibe competitivamente tanto aderência do *S. mutans* ao SAG imobilizado quanto à agregação na presença de SAG livre (CROWLEY et al. 1993). Além disso, a SBR tem papel fundamental na estrutura tridimensional, na expressão, estabilidade e na antigenicidade da proteína P1 de *S. mutans* (SEIFERT; BLEIWEIS; BRADY, 2004).

Ademais, essa região é antigênica e abrange tanto epítomos para células B como para T, e anticorpos direcionados para a SBR de *S. mutans* tem reatividade cruzada com a proteína P1 (Pag) de *S. sobrinus* (KELLY et al., 1995; LEHNER et al., 1990; SENPUKU et al., 1996; TAKAHASHI et al., 1991). As sequências TELARVQKANADAKAAY (repetida três vezes, com vários aminoácidos conservados) e TYEAALKQYEADL (repetida quatro vezes, com vários aminoácidos conservados) localizadas dentro da região A foram descritas como potenciais sítios de adesão aos componentes salivares (adesitomos) (BRADY et al., 1992; KELLY et al., 1995; MOISSET et al., 1994; NAKAI et al., 1993; OKAHASHI et al., 1993; SENPUKU et al., 1995).

Anticorpos séricos e da saliva de indivíduos naturalmente infectados pelo *S. mutans*, porém sem relatos de cárie, são capazes de reconhecer fortemente vinte sete decapeptídeos derivados da região A da proteína P1, indicando o papel protetor de anticorpos direcionados contra essa região (MATSUSHITA et al., 1994). Ainda, estratégias vacinais empregando peptídeos derivados desse segmento da P1 são capazes de bloquear a agregação e a adesão de *S. mutans* e reduzir o desenvolvimento de cárie dental em animais (HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2001; MICHALEK; KATZ; CHILDERS, 2001; MUNRO et al., 1993; TAKAHASHI et al., 1991; TSUHA et al., 2004). Demonstrando que, entre os domínios funcionais da proteína P1, essa região é o maior alvo vacinal para o controle da cárie dental humana.

1.5 Estratégias vacinais contra a cárie dental

O conceito de vacinação contra a cárie dental foi estabelecido pouco depois da determinação do papel do *S. mutans* no desenvolvimento da doença (LEHNER; CHALLACOMBE; CALDWELL, 1980; LOESCHE, 1986; TAUBMAN; NASH, 2006). As primeiras estratégias de controle da cárie empregaram a imunização do *S. mutans* completo pela via subcutânea e demonstraram resultados encorajadores com redução significativa da colonização oral pelo *S. mutans*. Entretanto, a observação que esse tipo de imunização poderia gerar anticorpos com reatividade cruzada com fibras cardíacas humanas e de coelho, reduziu gradativamente o interesse por essa abordagem. Consequentemente houve um crescente em estratégias de subunidade com proteínas e peptídeos derivados dos antígenos de superfície de *S. mutans*, principalmente contra a P1 (BOWEN, 1969; KOGA et al., 2002; LEHNER, 1992; LEHNER; CHALLACOMBE; CALDWELL, 1980; RUSSELL, 1987; WU; RUSSELL, 1990).

Anticorpos contra a proteína P1 bloqueiam a adesão rompendo com a colonização da cavidade oral pelo *S. mutans* (MA et al., 1998; MA; LEHNER, 1990). De fato, a proteína P1 tem mostrado ser um alvo promissor na imunidade protetora natural em humanos e tem sido estudada como um candidato em estudos de

imunização ativa de primatas não-humanos e murinos (LEHNER et al., 1981; MICHALEK; KATZ; CHILDERS, 2001; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009; SMITH; MATTOS-GRANER, 2008). Dados atuais tem demonstrado que além da proteína P1 inteira, fragmentos derivados dela são potenciais alvos em vacinas acelulares para o controle da cárie (BRADY et al., 2010; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009).

A SBR apresenta um enorme potencial protetor em estratégias contra a cárie dental visto que tanto anticorpos monoclonais como policlonais contra a região são fortes inibidores do primeiro estágio de adesão do *S. mutans* a superfície dental (BRADY et al., 1992; HAJISHENGALLIS et al., 1995; HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2001; LEHNER et al., 1981; SCULLY; LEHNER, 1979). A administração parenteral da proteína SBR é capaz de induzir altos títulos de IgG e inibir a colonização da cavidade oral de camundongos pelo *S. mutans* (TAKAHASHI et al., 1991; YU et al., 1997). Quando administrada por via de mucosas, como a via oral ou nasal, a SBR induz respostas sistêmicas e de mucosa potentes em modelos murinos desde que esteja fusionada a um adjuvante como a CT, LT-I, LT-II ou seus variantes (HAJISHENGALLIS et al., 1995, 1996, 2001). Contudo, em alguns casos uma dose reforço foi importante para indução de uma resposta imunológica pronunciada (RUSSELL; WU, 1991).

As estratégias usando a região SBR da proteína P1 como alvo vacinal foram principalmente baseadas na proteína recombinante expressa em *E. coli*, normalmente fusionada à proteínas de altos pesos moleculares como transportadora, ou mesmo secretada no periplasma bacteriano, a fim de reduzir a degradação proteolítica ou melhorar o processo de purificação e a imunogenicidade do antígeno (CROWLEY et al., 1993; HAJISHENGALLIS et al., 1995; MATSUMOTO-NAKANO et al., 2008; MUNRO et al., 1993; OKAHASHI et al. 1993; TOIDA et al., 1997). Baixo custo e alto rendimento são as duas maiores razões para a grande disseminação do uso de cepas de *E. coli* para a expressão de proteínas heterólogas. Contudo, muitos problemas estão associados à expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, como baixo rendimento, geração de proteínas insolúveis, contaminação por endotoxinas e a perda

de importantes determinantes imunológicos nativos (HARWOOD, 1992; SCHUMANN, 2007).

Tanto a resposta humoral sistêmica, com o extravasamento de IgG pelo fluido crevicular, como a resposta de mucosa, na forma de IgA salivar, contra a proteína P1 de *S. mutans* têm sido associadas à proteção contra a cárie dental (BRADY, 2005; BRADY et al., 2010; MICHALEK; KATZ; CHILDERS, 2001; TENOVUO; LEHTONEN; AALTONEN, 1990). Contudo, estratégias que promovam a indução de IgA secretor específico mostram-se mais promissoras visto que essa imunoglobulina encontra-se em maior concentração na saliva e na cavidade oral (LEHNER, 1992; MARCOTTE; LAVOIE, 1998).

O uso de proteínas solúveis ou peptídeos, principalmente pela via parental, não são métodos eficientes para induzir IgA nas mucosas ou altos títulos de IgG. Para isso, novas vias de imunização enteral como oral, nasal, tonsilar, nas glândulas salivares e outras foram exploradas, assim como a associação com potentes adjuvantes de mucosa, como a flagelina e as toxinas termo-lábeis (KOGA, 2002; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009).

A flagelina é um agonista do Toll-like 5 (TLR5) que é um receptor de padrões moleculares associados ao patógeno (HAYASHI et al., 2001). Apresenta um potente efeito adjuvante capaz de ativar tanto a resposta humoral quanto sistêmica após administração enteral ou parenteral (BRAGA et al., 2009, 2010; HONKO et al., 2006; SHI et al., 2012). Shi et al. (2012) demonstraram que a presença da proteína FliC de *Salmonella*, como adjuvante, em uma vacina de DNA codificando a porção N-terminal da proteína P1 administrada por via nasal aumentou respostas imunológicas sistêmicas e de mucosa. Como resultado foi observado uma redução da colonização pelo *S. mutans* e dos índices de cárie em ratos, sugerindo o potencial desta proteína como adjuvante para formulações vacinais contra a cárie dental.

A toxina termolábil de *E. coli* ETEC (LT) é um dos mais efetivos adjuvantes de mucosa conhecidos, contudo a toxicidade inerente da LT tem impedido seu uso em humanos. Diferentes metodologias já foram descritas para subverter este problema, como o uso de proteínas mutantes detoxificadas até o uso das subunidades não tóxicas desta proteína (FREYTAG; CLEMENTS, 2005; HOLMGREN et al., 2005).

Abordagens vacinais empregando a SBR como antígeno alvo associado a diferentes variantes de LT como adjuvante de mucosa foram capazes de induzir tanto respostas sistêmicas quanto de mucosa e, em alguns casos, respostas persistentes (CONNELL, 2007; HAJISHENGALLIS et al., 2005; MARTIN et al., 2000; ZHAO; ZHAO; RUSSELL, 2011).

Uma alternativa eficaz para o controle de doenças infecciosas é o uso de vetores bacterianos vivos de entrega. Esse tipo de abordagem apresenta diversas vantagens como o baixo custo, não ser invasivo, de fácil aplicação e potencial de uso em regiões geográficas afastadas (BOLTON et al., 2012; MESTECKY, 1987; RYAN; DALY; MILLS, 2001). Os vetores vivos bacterianos são baseados em patógenos atenuados, tais como *Salmonella* e *Listeria* (DARJI et al., 2000; LOEFFLER et al., 2006). As poucas estratégias vacinas anti-cárie usando veículos vacinais vivos carregando antígenos derivados da proteína P1 foram desenvolvidos com linhagens de *S. enterica* Typhimurium (HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 1999; HAJISHENGALLIS; MICHALEK; RUSSELL, 1996; HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2001; SALAM et al., 2006). Linhagens recombinantes de *S. enterica* foram construídas para expressar *in vivo* a SBR ou a SBR fusionada à CTB. A administração nasal e oral de ambas as linhagens foram capazes de induzir IgA específico na saliva e IgG no soro dos animais imunizados, entretanto para aumentar os níveis de anticorpos foi necessário uma dose reforço ou a co-administração de um adjuvante (CT). Apesar dos resultados promissores, o potencial risco de reversão para o fenótipo virulento deste tipo de abordagem tem reduzido o interesse por seu uso no desenvolvimento de formulações de vacina, em especial para seres humanos (DARJI et al., 2000; LOEFFLER et al., 2006).

Até o momento poucos ensaios clínicos em pequena escala em humanos foram realizados para testar a eficácia de formulações vacinais anti-cárie. Muitos dados conflitantes principalmente correlacionando negativamente a presença de IgA na saliva e a prevalência de cárie dental, assim como a observação de que muitas dessas estratégias induzem respostas imunológicas inadequadas em humanos, inviabilizaram a continuação dos ensaios e a disponibilização de um produto no mercado (RUSSELL et al., 2004; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009).

Atualmente, está disponível no mercado internacional um produto para imunização passiva baseada em um anticorpo monoclonal produzido em plantas transgênicas do Tabaco denominada de CaroRx[®] (Planet Biotechnology, Hayward, California, USA) que está em fase de aprovação pelo FDA (Food Drug Administration) nos EUA e já está licenciado na Europa. No entanto, a efetividade do tratamento é dependente de inúmeras aplicações profissionais do produto e o efeito apresenta um tempo limitado, cerca de um ano (MA et al., 1990, 1994; MA; LEHNER, 1990; MA; SMITH; LEHNER, 1987). Desta forma, o desenvolvimento de estratégias de imunização ativa que permitam o controle efetivo da cárie dental em humanos se faz necessária.

1.6 *Bacillus subtilis* e o desenvolvimento de vacinas

O *B. subtilis* é uma bacilo gram positivo, ubiqüitário, produtor de endosporos, que tem sido explorado como sistema alternativo para expressão de proteínas heterólogas com aplicações biotecnológicas e mais recentemente como veículo vacinal vivo tanto na forma de esporos como na forma de células vegetativas (HARWOOD, 1992; FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005; PACCEZ et al., 2006, 2007; PAULITZ; BELANGER, 2001). Além disso, os esporos de *B. subtilis* têm sido usados como probióticos para uso em humanos e animais (D'ARIENZO et al., 2006; FOLIGNE et al., 2012; GUO et al. 2006; GREEN et al., 1999; PERMPOONPATTANA et al., 2012; SHIVARAMAIAH et al., 2011).

O enorme potencial aplicado do *B. subtilis* é devido a muitas características peculiares, como: i) a formação de esporos, a forma de vida mais resiliente do planeta, que facilita sua estocagem e transporte; ii) ausência de membrana externa e, portanto, de contaminação com lipopolissacarídeos (LPS); iii) um grande conhecimento de sua genética e fisiologia, comparável ao conhecimento de *E. coli*, sendo considerado o modelo de estudo gram positivo; iv) diferentes sistemas de expressão e purificação disponíveis, v) sua segurança para uso em humanos, com o status GRAS (**G**enerally **r**egard **a**s **s**afe) conferido pelo FDA americano (MEIMA; VAN DIJL; BRON, 2004; WESTERS; WESTERS; QUAX, 2004).

Como sistema de expressão e purificação de proteínas heterólogas, o *B. subtilis* é uma alternativa em potencial aos modelos procariotos convencionais baseados em *E. coli*, isto porque é capaz de produzir moléculas com atividade biológica preservada e em grandes quantidades, sem a contaminação por endotoxinas (FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005; HARWOOD, 1992; MEIMA; PAULITZ; BELANGER, 2001; VAN DIJL; BRON, 2004; WESTERS; WESTERS; QUAX, 2004). Inúmeros vetores de expressão em *B. subtilis* estão disponíveis, estes empregam os mais diferentes promotores e direcionamento das proteínas heterólogas para compartimentos diferentes, intracelular ou extracelular (KAKESHITA et al., 2011; NGUYEN et al., 2005, 2006; NGUYEN; SCHUMANN, 2006; PACCEZ et al., 2007; PHAN; TROESCHEL et al., 2012; YANO et al., 2011).

Ao longo das últimas décadas a enorme capacidade de expressão e purificação de proteínas recombinantes usando linhagens de *B. subtilis* tem sido bem explorada. Excelentes resultados foram observados principalmente quando proteínas de bactérias gram positivas foram expressas, como o caso da estreptoquinase de *S. equisimilis* que apresentou uma grande estabilidade quando expressa em *B. subtilis* (HARWOOD, 1992; SCHUMANN, 2007; TERPE, 2006; WONG; YE; NATHOO, 1994). Excelentes resultados também foram observados com proteínas de interesse médico, como a interleucina humana 3 que foi purificada com sucesso a partir de *B. subtilis* e com um ótimo rendimento, por volta de 100 mg/L, e o hormônio de crescimento humano, por volta de 70 mg/L (OZDAMAR et al., 2009; WESTERS et al., 2005).

Além da expressão de proteínas de interesse médico os sistemas de expressão de *B. subtilis* foram utilizados para a produção de antígenos vacinais. Dentre os antígenos vacinais produzidos em *B. subtilis* destaca-se o antígeno PA de *B. anthracis*, a subunidade S4 de *Bordetella pertussis*, a proteína P1 de *Neisseria meningitidis*, as proteínas Omp2 e Hsp60 de *Chlamydia pneumoniae*, a proteína HpaG de *Xanthomonas oryzae*, e mais recentemente a proteína L1 do capsídeo do vírus do papiloma humano. Essas proteínas recombinantes foram produzidas em grandes quantidades, com estabilidade e promoveram a ativação de potentes respostas imunológicas humorais e celulares (AIRAKSINEN et al., 2003; BAEK et al.,

2012; HIMANEN et al., 1990; IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ et al., 1996; IVINS; WELKOS, 1986; IVINS et al., 1990; LIN et al., 2001; MUTTILAINEN et al., 1995).

Como veículo vacinal, o *B. subtilis* é uma alternativa segura, barata, não invasiva (sem uso de agulha) e com aplicação sobre doenças infecciosas, especialmente as causadas por patógenos que colonizam ou invadem o epitélio da mucosa. O uso do *B. subtilis* como veículo vacinal de mucosa é relativamente recente e pode ser dividido em duas abordagens de sucesso: i) expressão do antígeno na superfície dos esporos fusionado as proteínas de capa ou ii) dentro da célula vegetativa (ISTICATO et al., 2001; PACCEZ et al., 2006, 2007).

Na primeira abordagem, a proteína heteróloga é expressa no esporo em fusão com uma proteína exposta em sua superfície, como a CotB, CotC ou CotG, frequentemente denominada de estratégia OUT (fora) (DUC et al., 2003; ISTICATO et al., 2001; LEE et al., 2010a, b; MAURIELLO et al., 2004; NING et al., 2011; PERMPOONPATTANA et al., 2011; POTOT et al., 2010). Até o momento, foi fusionada a capa dos esporos apenas antígenos com interesse vacinal, para os quais eram esperadas respostas imunológicas protetoras. Essa estratégia permite uma melhor apresentação do antígeno carregado nos sítios aferentes do tecido linfóide associado à mucosa (MALT), induzindo respostas imunes adaptativas, tais como respostas de anticorpos específicos de mucosa (IgA) e sistêmicos (IgG) (CERAGIOLI et al., 2009; HOANG et al., 2008).

Na segunda abordagem utilizada com sucesso, a lógica é distinta e emprega plasmídeos, no qual o gene recombinante é expresso sob o controle de promotores ativos apenas na fase de célula vegetativa, imediatamente após a germinação dos esporos, denominada de estratégia IN (dentro) (PACCEZ et al., 2006, 2007). Esta abordagem de entrega de antígeno baseia-se no fato de que os esporos de *B. subtilis* germinam durante o trânsito através do trato gastrointestinal e depois da captura pelas células apresentadoras de antígeno (DUC et al., 2004; DUC; HOANG; CUTTING, 2003; HOA et al., 2001). Tais esporos recombinantes demonstraram induzir anticorpos específicos na mucosa (IgA fecal) e no soro (IgG) após administração pelas vias de mucosa (nasal ou oral) (FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005; LUIZ et al., 2008; PACCEZ et al., 2006, 2007).

Infelizmente, estratégias empregando os esporos ou células vegetativas de *B. subtilis* como carreadores vacinais demonstraram uma baixa imunogenicidade aos antígenos carregados (FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005). De fato, três fatores podem contribuir para a redução da imunogenicidade do *B. subtilis*, especialmente após a entrega por via oral. O primeiro fator pode ser atribuído à entrega de uma pequena quantidade de antígeno vacinal ao sistema imunológico e consequente falha na ativação deste. Um segundo fator, é a exposição natural e frequente aos esporos presentes nos alimentos ingeridos e água podendo levar a tolerância imunológica e, em consequência o desenvolvimento de mecanismos imunossupressores que reduzem ou bloqueiam a indução de respostas imunológicas mais fortes às proteínas de esporos e aos antígenos associados (CERAGIOLI et al., 2009; DUC et al., 2004). Por fim, outro fator que certamente afeta a imunogenicidade de esporos de *B. subtilis*, e nunca antes avaliado, é o rápido trânsito através do trato gastrointestinal após administração oral. Apesar da evidência de que os esporos de *B. subtilis* germinam durante o trânsito através do intestino de mamíferos, *B. subtilis* administrados oralmente, sejam na forma células vegetativas ou de esporos, são totalmente eliminados do intestino dos camundongos em menos de 72 horas, o que reduz a possibilidade de interação produtiva com o tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT) e com as células M presentes nas placas de Peyer (DUC; HOANG; CUTTING, 2003; DUC et al., 2004). Desta forma, abordagens que permitam o aumento do contato e o direcionamento dos esporos para o GALT podem resultar em potencialização da resposta imunológica contra o antígeno de interesse.

A expressão de proteínas heterólogas na superfície dos microrganismos é uma estratégia com aplicações em várias áreas do conhecimento como: microbiologia, biotecnologia e vacinologia. Os veículos vivos de entrega apresentam vantagens para a indução de respostas de anticorpos antígeno-específica quando expressam proteínas heterólogas em sua superfície, principalmente no caso de bactérias não patogênicas, como é o caso do *B. subtilis* (KLEMM; SCHEMBRI, 2000; SAMUELSON et al., 2002). Bactérias comensais não invasivas, em geral são ineficientes em gerar fortes respostas de anticorpos, contudo tem sido demonstrado que esses veículos vacinais podem ser melhorados pela co-expressão de adesinas

que irão auxiliar no direcionamento para o epitélio da mucosa (CANO et al., 1999; LILJEQVIST et al., 1999).

Adesinas presentes na superfície das bactérias permitem um íntimo contato com as células eucarióticas e são importantes na colonização do hospedeiro por microrganismos (NAVARRE; SCHNEEWIND, 1999). A especificidade da adesina bacteriana por um determinado receptor permitirá um direcionamento deste para sítios específicos, refletindo em tropismo por um tecido (KLEMM; SCHEMBRI, 2000).

A proteína SlpA de *Lactobacillus brevis* ATCC8287, assim como a invasina (InvA) de *Yersinia pseudotuberculosis*, são proteínas de superfície com papel de adesina que permite a colonização de superfícies do hospedeiro (CLARK; HIRST; HYNONE et al., 2004; JEPSON, 1998). A SlpA de *L. brevis* é o constituinte da camada S deste microrganismo, e é uma proteína altamente básica com massa molecular variando entre 38 – 55 kDa capaz de interagir com as proteínas da matriz extracelular como fibronectina, laminina e colágeno (VIDGRÉN et al., 1992; YASUI; YOD; KAMIYA, 1995).

A proteína invasina de *Y. pseudotuberculosis* permite a adesão e a subsequente internalização da bactéria por meio da ligação ao receptor β 1- integrina localizado na superfície das células M das placas de Peyer (CLARK; HIRST; JEPSON, 1998; LePORE, 2008). A interação da invasina com o receptor β 1- integrina induz uma reorganização do citoesqueleto da célula que forma pseudópodes que englobam e internalizam a bactéria (YOUNG; FALKOW; SCHOOLNIK, 1992). A porção C-terminal desta proteína, mais precisamente os últimos 197 resíduos de aminoácidos, são suficientes para a ligação da bactéria as células epiteliais, mas não para sua internalização (LEONG; FOURNIER; ISBERG, 1990).

A baixa imunogenicidade do antígeno carregado após o uso de bactérias lácticas como veículos vacinais vivos, incapazes de colonizar o trato gastrointestinal de mamíferos, induziu pesquisadores a empregar uma estratégia inovadora. Nessa abordagem a bactéria foi geneticamente modificada para expressar adesinas bacterianas com capacidade de reconhecer receptores de células do hospedeiro, permitindo o direcionamento e aumentando o contato com células intestinais. Linhagens de *Lactococcus lactis* recombinantes expressando a proteína A de ligação

a fibronectina de *Staphylococcus aureus* ou a internalina A de *Listeria monocytogenes* mostraram uma capacidade aumentada para se ligar e invadir células de mamíferos e foram mais eficientes como veículo de entrega para vacinas de DNA (GUIMARÃES et al., 2005, 2006; INNOCENTIN et al., 2009). Adicionalmente, a expressão da porção N-terminal da SIpA de *L. brevis* em *L. lactis* permitiu que esta bactéria, antes não adesiva, aderisse a fibronectina e as células intestinais humanas *in vitro* (AVÄLL-JÄÄSKELÄINEN; LINDHOLM; PALVA, 2003).

Uma estratégia similar foi empregada com sucesso usando uma *E. coli* não patogênica expressando a invasina de *Y. pseudotuberculosis*. A linhagem recombinante de *E. coli* foi capaz de invadir células de mamíferos e entregar plasmídeos e proteínas produzindo efeitos terapêuticos em tumores (CRITCHLEY et al., 2004; CRITCHLEY-THORNER; STAGG; VASSAUX, 2006; GRILLOT-COURVALIN et al., 1998). Apesar do potencial deste tipo de abordagem, ela nunca foi aplicada a outras bactérias gram positivas não invasivas, tais como o *B. subtilis*.

1.7 Vacinas de mucosa baseadas em *B. subtilis*

A via de imunização tem efeito significativo sobre a natureza da resposta imunológica. Nas últimas décadas tem havido um crescente interesse em vacinas de administração mucosa, visto que estas são alternativas seguras, não precisam de agulhas o que resulta em maior aceitabilidade pela população e não necessitam de profissionais treinados para aplicação. Além disso, vacinas de mucosa são capazes de estimular tanto respostas imunológicas de mucosa (IgA) como sistêmicas (IgG), sendo efetivas contra um grande número de patógenos (BELYAKOV; AHLERS, 2009; NEUTRA; KOZLOWSKI, 2006). Entretanto, há a necessidade do uso de veículos vacinais com estabilidade térmica e resistência aos estresses induzidos quando da passagem pelas vias de mucosa, esse é o caso dos esporos de *B. subtilis*.

Dentre as vias de mucosa utilizadas com o *B. subtilis* como veículo vacinal, podemos destacar as vias oral, nasal e, mais recentemente, a sublingual (AMUGUNI; TZIPORI, 2012; LUIZ et al., 2008; PACCEZ et al., 2007). As primeiras estratégias usando *B. subtilis* como veículo vacinal foram baseadas na administração oral das

linhagens vacinais contra uma variedade de patógenos humanos e de animais. Contudo, apesar dos resultados iniciais promissores desta via de administração, o pouco conhecimento do processamento do antígeno, a necessidade de usar uma grande quantidade de antígeno e altos números de doses, associados a muitos insucessos induziram a busca de outras vias de administração (CUTTING et al., 2009; FU et al., 2008; HU et al., 2011; LUIZ et al., 2008; NING et al., 2011; PACCEZ et al., 2007; PERMPOONPATTANA et al., 2011).

A via nasal tem demonstrado potencial aplicação visto que é capaz de induzir respostas sistêmicas e de mucosa superiores a administração oral, com número de doses menores e concentração menor do antígeno. Abordagens vacinais baseadas em *B. subtilis*, principalmente aquelas empregando esporos recombinantes expressando o antígeno na superfície, usando essa via produziram resultados similares e, em muitos casos, superiores aos obtidos com a imunização oral, com produção de altos títulos de IgA nas mucosas e de IgG sérico, permitindo a redução da quantidade de esporos usados e melhora do protocolo vacinal (DUC et al., 2007; LEE et al., 2010; LEE et al., 2010b). Contudo, a segurança desta via tem sido criticada desde que alguns estudos demonstraram que antígenos inalados ou adjuvantes co-administrados podem percorrer um caminho retrógrado pelo bulbo olfativo e causar efeitos colaterais (ARMSTRONG et al., 2005).

Mais recentemente grupos tem explorado a via sublingual como alternativa a via oral e, possivelmente, para via nasal. Na via sublingual os antígenos não sofrem com a degradação por enzimas, além disso, o antígeno é rapidamente absorvido. De fato, trabalhos usando esporos de *B. subtilis* tem demonstrado a capacidade desta via de induzir anticorpos sistêmicos e de mucosa protetores contra a toxina tetânica em camundongos e leitões (AMUGUNI et al., 2011, 2012). Contudo, estudos mais aprofundados são necessários para caracterizar melhor a captura, processamento e geração de respostas contra os antígenos carregados pelo *B. subtilis* usando essa via de administração.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este projeto teve como objetivo desenvolver e caracterizar diferentes estratégias vacinais contra a cárie dental humana causada pelo *S. mutans* usando linhagens geneticamente modificadas de *B. subtilis*. As linhagens de *B. subtilis* foram modificadas para expressar como antígeno vacinal um fragmento (P1₃₉₋₅₁₂) da proteína P1, a maior proteína de superfície de *S. mutans*, claramente envolvida na adesão do patógeno a superfície dental.

2.2 Objetivos específicos

O trabalho de tese envolveu três objetivos específicos, cada um deles representando uma etapa das pesquisas realizadas. (i) Caracterização das propriedades antigênicas e imunogênicas de um novo fragmento derivado da proteína P1 de *S. mutans*, a proteína P1₃₉₋₅₁₂, expresso em linhagem recombinante de *B. subtilis*; (ii) Uso da proteína P1₃₉₋₅₁₂ como alvo em vacinas de subunidade em associação com diferentes adjuvantes; (iii) Construção e caracterização de um novo sistema de entrega baseado em esporos de *B. subtilis* com capacidade interagir com células intestinais e avaliação do potencial vacinal contra o *S. mutans*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens e vetores bacterianos, condições de cultivo

As linhagens e os vetores bacterianos utilizados nesta tese estão descritos nos Quadros 1 e 2. As condições de cultivo foram específicas para cada linhagem, sendo que as cepas de *S. mutans* foram cultivadas em meio THY ou BHY a 37 °C com 5% de CO₂. A linhagem de *S. mutans* PC3370 foi cultivada em meio contendo tetraciclina (15 µg/ml) e a linhagem PC3370C em meio com tetraciclina (15 µg/ml) e canamicina (500 µg/ml). As linhagens de *B. subtilis* e de *E. coli* foram mantidas em meio Luria Bertani (LB) com antibióticos específicos a 37 °C em aerobiose.

3.2 Competência e transformação em *E. coli*

A competência química e transformação térmica de *E. coli* foi realizada de acordo com protocolos descritos por Sambrook et al. (2001). Para o preparado de competência uma unidade formadora de colônia (ufc) de *E. coli* DH5α, previamente isolada em meio LB contendo MgCl₂ (25 mM), foi inoculada em 5 ml de LB e incubada a 37 °C, 200 rpm por 16 horas. Depois, 500 µl da cultura foi inoculada em 50 ml de LB e incubada a 37 °C até atingir a D.O_{600nm} de 0.5 – 0.6. Em seguida, a cultura foi mantida em gelo por 15 minutos e depois centrifugada (5.000 rpm, 10 minutos, 4°C). As células foram ressuspensas em 16 ml de RF1 (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂.4H₂O, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl₂.2H₂O, 15% (peso/vol), pH ajustado para 5.8 usando 0.2 M de ácido acético) e mantidas em gelo por 60 minutos, em seguida foram centrifugadas (5.000 rpm, 10 minutos, 4 °C). Logo após, a amostra foi ressuspensa em 4 ml de RF2 (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂.2H₂O, 15% (peso/vol), pH ajustado para 6.8 usando 1 M de NaOH) e mantida em gelo por 15 minutos. Amostras de 200 µl foram imediatamente congeladas usando nitrogênio líquido e depois estocadas a – 80 °C.

Para a transformação foi usada uma amostra de células quimiocompetentes (200 µl) para cada vetor a ser transformado. As células foram incubadas em gelo por 10 minutos e a mistura de ligação foi adicionada. O conjunto foi incubado em gelo por 35 minutos e colocado em banho-maria a 42 °C por 2 minutos. Imediatamente, a mistura foi incubada em gelo por 10 minutos e foi adicionado 800 µl de SOC (2% triptona (peso/vol), 0.5% extrato de levedura (peso/vol), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glicose), para cada tubo de transformação. Novamente, a amostra foi incubada por 90 minutos a 37 °C com agitação leve (100 rpm). A suspensão foi semeada em placas de LB contendo os antibióticos de escolha e mantida a 37 °C por uma noite, para obtenção das colônias transformantes.

3.3 Competência e transformação em *B. subtilis*

As linhagens de *B. subtilis* preparadas para transformação seguiu protocolo descrito por Anagnostopoulos e Spizizen (1961). O *B. subtilis* torna-se competente após cultivo em meio HS (20% de glicose, 0.1% de L-triptofano, 10% de extrato de levedura, 2% de casaminoácidos, 8% de arginina e 0.4% de histidina) até o início da fase estacionária (D.O_{600nm} igual ou superior 3). Nessa D.O foi adicionado 1 ml de glicerol 80% para cada 10 ml de cultura competente e esta foi separada em amostras (1 ml) armazenadas a – 80 °C até sua utilização.

Para a transformação de *B. subtilis* uma amostra de célula competente foi inoculada em 10 ml de meio LS (S-Base Mg²⁺ 1X; 20% glicose; 0.1% L-triptofano; 2% casaminoácidos; 2% extrato de levedura; 500 mM MgCl₂). A cultura foi incubada por 2 horas a 30 °C, sob agitação constante, após este período foi adicionado 100 µl de EGTA (etilenoglicol tetracético). Novamente, a cultura foi incubada a 30 °C por 5 minutos, uma amostra de 1 ml foi retirada e o vetor de interesse foi adicionado. Seguiu-se nova incubação a 37 °C por 2 horas. Ao final, a cultura foi centrifugada, o precipitado ressuspendido em 200 µl de meio LS, semeado em placas LB contendo o antibiótico de escolha e incubado por uma noite à 37 °C.

Quadro 1 - Linhagens empregadas e construídas neste trabalho.

| Linhagens | Características | Referência |
|---------------------------|---|---|
| <i>S. mutans</i> | | |
| UA159 | Linhagem selvagem do sorotipo <i>c</i> ; genoma sequenciado | AJDIC et al.(2002) |
| NG8 | Linhagem selvagem do sorotipo <i>c</i> , Erm ^S , Spec ^S , Kan ^S | LI et al.(2001) |
| PC3370 | <i>S. mutans</i> NG8 <i>spaP::tet^R</i> | CROWLEY et al. (1999) |
| PC3370C | PC3370 contendo o vetor pMAD (P1 completa); Tet ^R ; Kan ^R | BRADY et al. (1998) |
| <i>E. coli</i> | | |
| DH5α | <i>F</i> ϕ80dlacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> , <i>recA1</i> <i>endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺ phoA supE44Δ thi-1 gyrA96 relA1</i> | Invitrogen™ |
| CG14 | M15(pREP4) albergando o vetor pCG14 | BRADY et al. (1998) |
| <i>B. subtilis</i> | | |
| 1012 | <i>leuA8 metB5 trpC2 hsrDRM1 amyE::neo.</i> | WEHRL; NIEDERWEIS; SCHUMANN, (2000) |
| DV701 | 1012 transformada com o vetor pLDV701 (P1 ₃₉₋₅₁₂ sobre o controle do promotor <i>P_{grac}</i>). | Este trabalho |
| LDV700 | 1012 transformado com pHCMC03. | Este trabalho |
| LDV702 | 1012 transformada com vetor pLDV702. | Este trabalho |
| BsSlpA | 1012 expressando o gene <i>slpA</i> de <i>L. brevis</i> (<i>thrC::slpA-Spec^R</i>) | Este trabalho |
| LDV703 | BsSlpA transformada com o vetor pLDV702. | Este trabalho |
| BsInvA | 1012 expressando a proteína InvA (<i>invA</i>) de <i>Y. pseudotuberculosis</i> (<i>thrC::invA-Spec^R</i>). | Este trabalho |
| LDV704 | BsInvA transformado com pLDV702. | Este trabalho |
| BsInv600 | 1012 expressando a região ligadora da proteína InvA (<i>inv600</i>) de <i>Y. pseudotuberculosis</i> (<i>thrC::inv600-Spec^R</i>). | Este trabalho |
| LDV705 | BsInv600 transformado com pLDV702. | Este trabalho |

Quadro 2 - Vetores empregados e construídos neste trabalho.

| Plasmídios | Características | Referência |
|-------------|--|--|
| pGEM-T-Easy | Amp ^r ; operon <i>lac</i> ; T- end | Promega™ |
| pCG14 | Derivado do pQE-30 clonado com o gene <i>spaP</i> que codifica para os aminoácidos 39 a 1561 da proteína P1 | BRADY et al. (1992) |
| pGP1N | pGEM-T- Easy clonado com a sequência que codifica para a região N-terminal da proteína P1 de <i>S. mutans</i> UA159 (P1 ₃₉₋₅₁₂) | Este trabalho |
| pDG1731 | Vetor para integração ectópica no gene <i>thrC</i> ; Amp ^R , Spec ^R | GUEROUT-FLEURY; FRANDSEN; STRAGIER, (1996) |
| pDGcotB | pDG1731 contendo o fragmento que codifica para a região N-terminal do gene <i>cotB</i> e seu promotor proveniente da linhagem 1012 de <i>B. subtilis</i> | Este trabalho |
| pSlpA | pDGcotB clonado com o gene <i>slpA</i> de <i>L. brevis</i> | Este trabalho |
| pInvA | pDGcotB clonado com o gene <i>invA</i> de <i>Y. pseudotuberculosis</i> | Este trabalho |
| pInv600 | pDGcotB clonado com a região ligadora do gene <i>invA</i> | Este trabalho |
| pHT08 | Amp ^R ; Cm ^R ; Promotor induzível por IPTG (<i>Pgrac</i>); His-tag | NGUYEN; PHAN; SCHUMANN, (2007) |
| pLDV701 | Vetor pHT08 clonado com o gene <i>spaP1N</i> (codifica para a proteína P1 ₃₉₋₅₁₂) | Este trabalho |
| pHCMC03 | PgsiB (Promotor induzível por estresse), Ap ^R ; Cm ^R | PHAN; NGUYEN; SCHUMANN (2006) |
| pLDV702 | Vetor pHCMC03 clonado com o gene <i>spaP1N</i> (codifica para a proteína P1 ₃₉₋₅₁₂) | Este trabalho |

3.4 Lise de células vegetativas de *B. subtilis*

Amostras de células de *B. subtilis* foram vigorosamente ressuspensas em tampão lise (30% sacarose, 50 mM Tris-HCl 7.2, 800 µg/ml de lisozima) e incubadas a 37 °C por 15 minutos. Foi adicionado 10 µl de SDS (dodecil sulfato de sódio) seguido por homogeneização vigorosa. As amostras lisadas foram armazenadas a – 80 °C até o momento do uso.

3.5 Extração de proteínas totais de *S. mutans*

Culturas de *S. mutans* crescidas por 16 horas em meio BHY ou THY foram centrifugadas (7.000 rpm, 5 minutos). As células foram lavadas duas vezes vigorosamente com água destilada estéril. Em seguida, o material foi ressuspendido em 1/3 do volume inicial em água destilada e submetido a três ciclos térmicos (30 minutos à -80 °C, seguido por 30 minutos à 37 °C). A mistura foi homogeneizada vigorosamente com 800 µg/ml de lisozima e incubado por 1 hora a 37 °C. Por fim, foi adicionado 1/10 volume de SDS a 10% e a mistura foi ressuspendida vigorosamente. As amostras lisadas foram armazenadas a – 80 °C até o momento do uso.

3.6 Indução e purificação da proteína CG14 a partir de *E. coli*

A indução e purificação da proteína P1 completa (CG14) de *S. mutans* NG8 em sistema pQE-30 de *E. coli* seguiu protocolo descrito por Brady et al., 1998.

3.7 Produção de anticorpos anti-P1 de *S. mutans*

A proteína purificada P1 (CG14) foi inoculada por via subcutânea em camundongos Balb/c. O protocolo de imunização foi o de cinco doses com intervalo de 15 dias e a coleta de soro foi feita 15 dias após a última dose. Foi administrado por

dose 10 µg de proteína/animal. A primeira dose foi administrada com adjuvante completo de Freund e as demais com adjuvante incompleto de Freund. As amostras de soro foram preparadas para uso e estocadas a – 20 °C até uso.

3.8 Construção do vetor de clonagem pGP1N

3.8.1 Isolamento de DNA genômico de *S. mutans*

Uma amostra de *S. mutans* UA159 crescido (2 ml) por uma noite a 37 °C foi centrifugada (7.000 rpm, 5 minutos). Ao precipitado foi adicionado 400 µl de tampão de lise (50 mM EDTA, 0.5% β-mercaptaetanol, 3% SDS, 50 mM Tris HCl pH 7.2). O precipitado foi ressuscitado vigorosamente e depois incubado por uma hora a 65 °C com agitação a cada 15 minutos. Após a incubação, as amostras lisadas foram tratadas com igual volume de fenol:clorofórmio (1:1) e submetidas à centrifugação. A fase aquosa (superior) foi retirada e transferida para outro tubo, ao qual foi adicionado igual volume de clorofórmio:alcóol isoamílico (24:1). Novamente a amostra foi centrifugada e a fase superior removida e transferida para outro tubo. Em seguida, foi adicionado 200 µl de isopropanol absoluto e 40 µl de acetato de sódio 3 M (NAOAc), as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 70% e centrifugado (5 minutos, 10.000 rpm), o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco foi ressuscitado em 30 µl de água milli-Q estéril contendo 50 µg/ml de RNase. As amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8% e estocadas a -20 °C.

3.8.2 Amplificação do gene *spaP1N* por reação em cadeia da polimerase (PCR) e clonagem no vetor pGEM-T-easy

A região do gene *spaP* que codifica para sua porção N-terminal sem o peptídeo sinal e uma pequena porção da região V da proteína P1, foi denominada nesta tese de *spaP1N* e foi amplificada usando iniciadores específicos desenhados (Quadro 3). Para as reações de amplificação foram empregadas 100 ng de DNA genômico da

linhagem UA159 de *S. mutans*, 1.5 pmoles de cada iniciador, 1.6 mM de dNTP, 4 mM de MgCl₂, 1X tampão da enzima e 1 unidade de Taq DNA polimerase Platinum® (Promega, Madison, Wisconsin, USA) para um volume final de 50 µl. O ciclo de PCR empregado foi: 2 minutos a 92 °C, 2 minutos a 94 °C, 3 minutos a 56 °C, 2 minutos a 72 °C, repetição por 29 vezes, 20 minutos a 72° C. O produto gerado foi analisado com eletroforese em gel de agarose 0,8%.

O produto de PCR originado foi purificado usando o kit GFX® (Amersham, USA) segundo método descrito pelo fabricante e posteriormente, submetido a reação de adição de cauda poli-A. Para a reação foram empregados 100 ng de fragmento de PCR purificado, 0.5 mM de dATP, tampão enzimático 1X e 1 unidade de enzima CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*, Fermentas®, Pittsburgh, Pensilvânia, USA) para um volume final de 50 µl. A reação foi incubada por 15 minutos a 37 °C, seguida por inativação a 70 °C por 5 minutos. Novamente, os produtos foram purificados com kit GFX.

O fragmento preparado foi utilizado para a clonagem no vetor pGEM-T-Easy (Promega), sendo utilizado 150 ng de inserto, 50 ng de vetor, 1 unidade de T4 DNA ligase, 1X tampão enzimático, 1X polietilenoglicol (PEG 4000) e H₂O milli-Q q.s.p 10 µl. A reação foi incubada por 1 hora a 22° C e depois por uma noite a 4° C. A mistura de ligação foi transformada em linhagem quimiocompetente de *E. coli* K12 por método de choque térmico (SAMBROOK et al., 2001). As colônias de *E. coli* resistentes à ampicilina e deficientes na conversão do X-gal (colônias brancas) foram submetidas ao isolamento do DNA plasmidial e clivagem com enzimas de restrição para confirmação da clonagem dos fragmentos amplificados (SAMBROOK et al., 2001). O vetor originado foi denominado de pGP1N (Quadro 2) e foi confirmado por sequenciamento.

Quadro 3 - Iniciadores desenhados para a amplificação dos genes de interesse.

| GENE | NOME | SÍTIO DE RESTRIÇÃO ¹ | SEQUÊNCIA |
|---------------|--------|---------------------------------|-------------------------------------|
| <i>spaP1N</i> | FWspaP | <i>Bam</i> HI | aaaggatccatggatgaaacgaccactac |
| | RVsbr | <i>Aat</i> II | cgcgacgctatttggctcaagatcatagac |
| <i>cotB</i> | CotB5 | <i>Bam</i> HI | ggccatggatccacggattagccgttgtcc |
| | CotB3 | <i>Hind</i> III | ggccataagcttggatgattgatcatctgaagatt |
| <i>slpA</i> | SlpAFw | <i>Hind</i> III | caacgactgctaagcttatgaagtcatacgct |
| | SlpARv | <i>Eco</i> RI | ggccatgaattccggtatcgttgggtggc |
| <i>invA</i> | InvAFw | <i>Hind</i> III | atatccctaaagcttgacctacgctgaccggt |
| | InvA3 | <i>Eco</i> RI | ggccatgaattctattgacagcgcacagagcg |
| <i>Inv600</i> | InvA5 | <i>Hind</i> III | ggccataagcttctttccagccaatcagtga |

¹ Sequência de restrição sublinhada

3.9 Construção do vetor de expressão pLDV701

A subclonagem do gene *spaP1N* no vetor de expressão pHT08 de *B. subtilis* envolveu a obtenção do fragmento por meio de dupla digestão com as enzimas *Bam*HI e *Aat*II a partir do vetor p*GP1N*, assim como digestão do vetor pHT08 com as mesmas enzimas. Para tal reação foram empregados 200 ng de vetor, 1X tampão enzimático, 1 unidade de *Bam*HI, 1 unidade de *Aat*II e H₂O q.s.p 50 µl, a digestão foi mantida por 2 horas a 37° C. Após este período, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% e a banda correspondente ao fragmento de interesse, aproximadamente 1.4 kb, foi excisada, e purificado com kit GFX segundo instruções do fabricante. O produto purificado e quantificado foi ligado empregando a reação de ligação: 150 ng de inserto, 50 ng de vetor, 1 unidade de T4 DNA ligase, 1X tampão enzimático, 1X PEG 4000 e H₂O milli-Q q.s.p 10 µl. A reação foi incubada por 1 hora a 22 °C e depois por uma noite a 4 °C. A mistura de ligação foi transformada em linhagem competente de *E. coli* K12 DH5α. As colônias que cresceram em meio seletivo foram isoladas e submetidas a extração de DNA plasmidial, seguida de análise de restrição com as correspondentes enzimas e visualização em gel de agarose. O vetor construído foi denominado de pLDV701 (Quadro 2).

3.10 Expressão da proteína recombinante P₁₃₉₋₅₁₂ em linhagem de *B. subtilis* LDV701

O vetor pLDV701 construído e o vetor pHT08 (controle) foram introduzidos por transformação natural em células competentes da linhagem 1012 de *B. subtilis*, originando as linhagens LDV701 e LDV700, respectivamente (Quadro 1). Um clone recombinante transformado com o vetor pLDV701 e outro com pLDV700 foram selecionados e submetidos a indução da expressão proteica. As linhagens de *B. subtilis* LDV701 e LDV700 (controle) foram crescidas em meio LB, com 30 µg/ml de cloranfenicol a 37 °C sob agitação constante (200 rpm) por 16 horas. Após esse período, 1 ml do pré-inóculo foi diluído em 50 ml de meio LB com cloranfenicol (20 µg/ml) e incubado a 37 °C sob agitação até atingir a D.O_{600nm} de 0,6-0,8. Nesta D.O

foi retirado 1 ml da cultura, centrifugado (5 minutos, 7.000 rpm). O precipitado, denominado de T0 (tempo 0), foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. A indução da expressão da proteína P1₃₉₋₅₁₂ foi realizada com a adição de IPTG (Isopropil β -D-tiogalactosídeo) na concentração final de 1 mM ao restante da amostra. Após a adição do agente indutor a linhagem foi cultivada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação por mais 4 horas. Ao final a amostra induzida foi centrifugada (7.000 rpm, 10 minutos), e o precipitado (T4) foi congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As amostras correspondentes ao T0 e T4 de *B. subtilis* foram lisadas conforme protocolo de lise proteica e preparados com tampão de amostra de SDS-PAGE. As suspensões foram aquecidas a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos e depois analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (SAMBROOK et al., 2001).

3.11 Fracionamento da amostra induzida de LDV701

Inicialmente, os precipitados induzidos de *B. subtilis* LDV701 e LDV700 foram submetidos a ressuspensão vigorosa com 1/10 do volume de tampão F (0.1 M Tris HCl pH 7.0, 0.5 M NaCl) e lisozima (800 $\mu\text{g/ml}$), seguido por uma incubação em gelo por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 0.01% SDS e 0.01 mM PMSF (fenilmetanosulfonilfluorido), e as suspensões foram sonicadas por 2.5 minutos, com pulso ativo de 30 segundos e pausa de 1 minuto, com amplitude mínima de 40% por 3 vezes. Após o fracionamento, as amostras foram centrifugadas (1 hora, 13.000 rpm, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$), o precipitado foi separado do sobrenadante e estes foram denominados de extrato insolúvel (I) e solúvel (S), respectivamente. Amostras dos extratos solúveis e insolúveis foram preparadas com tampão de amostra, fervidas por 5 minutos, e analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida. A concentração de proteínas foi determinada usando kit de quantificação proteica BCA (Pierce[®], Rockford, Illinois, USA), com soro albumina bovina como padrão.

3.12 Purificação da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ a partir de linhagem recombinante de *B. subtilis*

O extrato solúvel da linhagem LDV701 foi aplicado no aparelho FPLC (*fast performance liquid chromatograph*) AKTA usando colunas niqueladas segundo instruções do fabricante (Amersham Bioscience[®]). As amostras foram eluídas com tampão B (0.1 M Tris HCl, 0.5M NaCl, pH 7.5) com concentrações crescentes de imidazol (0.05 M até 1 M) e as eluições foram verificadas em gel de poliacrilamida.

3.13 SDS-PAGE e *Western blot* da proteína P1₃₉₋₅₁₂

A eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi feita segundo protocolo descrito por Laemmli (1970), e usando o aparelho Mini Protean II vertical electrophoresis unit (Miniprotean, BioRad[®]). Para os ensaios com a proteína P1 completa foram usados géis de poliacrilamida com concentração de 7.5%, para os demais ensaios foram empregados géis de 12.5%. Os *Western blots* foram realizados usando incubação das membranas de nitrocelulose com anticorpo anti-P1 específico (1:3,000) ou anti-P1₃₉₋₅₁₂ (1:2,000). As bandas reativas foram detectadas com kit de quimio luminescência (Super Signal[®], Pierce), como descrito pelo fabricante.

3.14 Expressão e purificação dos fragmentos da proteína P1

Os fragmentos da P1 (CK2, LT1, MA41, NR5) foram produzidos e purificados seguindo os protocolos descritos por McArthur et al. (2007); Rhodin et al. (2004); Robinette et al. (2009, 2011).

3.15 Preparação dos anticorpos monoclonais (mAbs) anti-P1

Os mAbs anti-P1 (mAb 3-8D, 1-6F, 4-9D e 4-10A) foram obtidos de hibridomas previamente estabelecidos no laboratório da Dra L. Jeannine Brady (AYAKAWA et al.,

1987). Todos os mAbs empregados neste trabalho foram purificados seguindo o protocolo descrito por Robinette et al. (2009).

3.16 Reatividade dos anticorpos monoclonais anti-P1 com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ por meio de *Western blot*

A proteína P1₃₉₋₅₁₂ recombinante purificada de *B. subtilis* foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 7% e transferida para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com PBS- Tween 20 (0.3%) e, em seguida, foram incubadas com os diferentes mAbs anti-P1(1-6F, 3-8D, 4-9D e 4-10A). As membranas foram lavadas, incubadas com anti-IgG de camundongo marcado com a peroxidase (Southern Biotechnology Associates) e reveladas com solução de 4-cloro-1 naftol. Membranas controles foram feitas com o soro anti-P1₃₉₋₅₁₂.

3.17 Determinação da reatividade dos mAbs anti-P1 com os fragmentos da proteína P1 e a proteína P1₃₉₋₅₁₂ por meio de ELISA

A reatividade dos mAbs com a proteína P1 nativa e os fragmentos da P1 foi realizada por meio de ensaio de ELISA. Placas de ELISA foram recobertas com a bactéria completa NG8 preparada (duas lavagens com PBS e ressuspensa para a D.O final de 1) ou 200 ng/poço das proteínas purificadas (CG14, MA41, LT1, NR5 e P1₃₉₋₅₁₂) em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.6). As proteínas na forma desnaturada foram obtidas após tratamento térmico (100 °C, 10 minutos) e para a bactéria completa NG8 após 5 minutos à 42 °C. Os mAbs foram adicionados aos poços e diluições seriadas (1:2) foram realizadas. A reatividade foi detectada usando anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase. As placas foram reveladas com O-fenilenodiamina (OPD, 0.4 mg/ml, Sigma Aldrich) e H₂O₂, as reações foram interrompidas após a adição de 2 M H₂SO₄. A absorvância a 492 nm foi medida em um leitor de microplacas (LabSystem). Todas as amostras testadas foram analisadas em duplicata. As curvas de diluições foram elaboradas para cada amostra.

3.18 Preparo da aglutinina salivar (SAG)

Foi coletada saliva de cinco doadores saudáveis e a SAG isolada segundo protocolo descrito por Brady et al. (1992). Resumidamente, a saliva foi coletada em tubo de 50 ml cônico em gelo por 1 hora, em seguida todo o material foi agrupado e centrifugado (8.000 rpm, 20 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi separado e misturado com igual volume de KPBS (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.2) e 2 µl de CaCl₂ (0.1 M)), de *S. mutans* NG8 (D.O. = 1) e 1 mM de CaCl₂. O conjunto foi incubado 30 minutos a 37 °C com agitação leve. Após, o material foi centrifugado (8.000 rpm, 20 minutos, 4 °C) e o precipitado lavado 1X com PBS. A SAG foi eluída após ressuspensão do conjunto em 25 ml de PBS contendo 1 mM de EDTA e posterior, centrifugação e recuperação do sobrenadante. O sobrenadante foi filtrado (filtros Millipore 0.22 µm) e submetido à diálise com PBS gelado por uma noite à 4 °C. Por fim, o tampão PBS foi trocado por mais duas vezes em um período de 4 horas e o SAG purificado foi quantificado por kit de quantificação proteica BCA (Pierce®), com soro albumina bovina como padrão.

3.19 Ensaio de ligação da P1₃₉₋₅₁₂ à SAG imobilizada em microchip via sistema BIAcore

A ligação do fragmento P1₃₉₋₅₁₂, na forma solúvel ou desnaturada, à SAG foi feita usando “surface plasmon resonance” (SPR) no aparelho BIAcore 3000 (GE healthcare, Salt Lake City, Utah, USA). A SAG foi imobilizada no chip CM5 (GE healthcare) com tampões e condições de injeção conforme descrito por Oli et al. (2005). Vinte microlitros da proteína em cada forma (solúvel ou desnaturada) em uma concentração de 500 ng foram injetadas sobre as superfícies do chip. Entre os experimentos 10 µl de tampão de regeneração foi usado. Os sinais da superfície controle (FC1 – não recoberta com a aglutinina salivar) foram subtraídos daqueles produzidos na superfície de teste (FC2 – recoberta com SAG) para produzir o

sensograma (Δ RU). Os dados foram analisados no software BIAEvaluation (v4.2, BIAcore, UF, USA).

3.20 Regime vacinal e processamento das amostras

Grupos de 5 animais Balb/c fêmeas, com idade entre 6-8 semanas, foram imunizadas com 5 doses (10 μ g/animal) de: P1, P1₃₉₋₅₁₂ ou P1₃₉₋₅₁₂ desnaturada por fervura (10 minutos, 100 °C) (P1₃₉₋₅₁₂ d) em intervalos de 15 dias. A primeira dose foi administrada com adjuvante completo de Freund e as subsequentes com o adjuvante incompleto de Freund. As amostras de soro foram colhidas um dia antes da primeira dose (amostras pré-ímmunes) e no dia anterior a cada nova dose. O sangue foi coletado por punção submandibular. O sangue foi mantido a temperatura ambiente por 30 minutos, depois foi incubado a 4 °C por mais 30 minutos e por fim, centrifugados (5.000 rpm, 30 minutos, 4 °C) e o soro foi separado. O material foi armazenado a – 20 °C até o momento do uso.

3.21 Produção de anticorpos contra toda bactéria *S. mutans*

Soros contra toda a bactéria *S. mutans* PC3370 (anti-Smu Δ P1) e PC3370C (anti-Smu) foram gerados após imunização intravenosa de animais Balb/c fêmeas (n=5) com 5 doses com intervalos de duas semanas. Cada dose continha 7 x 10⁹ ufc de bactéria em 100 μ l de PBS 1 X. As doses foram preparadas a partir de culturas de *S. mutans* crescidas até a D.O₆₀₀ de 2 em meio THY em capnofilia à 37 °C. As amostras de soro foram coletadas duas semanas após a última dose, agrupadas e estocadas a – 20 °C. As amostras foram testadas para reatividade contra as proteínas P1 recombinante completa, P1₃₉₋₅₁₂ e P1₃₉₋₅₁₂d por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA).

3.22 Adsorção dos anticorpos IgG anti-P1 com as proteínas P1₃₉₋₅₁₂ e P1_{39-512d}

O soro gerado com a proteína P1 recombinante foi incubado com as proteínas P1₃₉₋₅₁₂ e P1_{39-512d} purificadas para remoção de anticorpos específicos direcionados contra os epítomos destes fragmentos. A adsorção foi realizada em placas de 96 poços MaxiSorp (Nunc) previamente recobertas com as proteínas de interesse (200 ng/poço). Amostras do soro anti-P1 diluídos (1:10⁵) foram aplicadas aos poços das placas e mantidos por 2 horas à 37 °C. Os soros foram removidos e avaliados quanto sua reatividade residual com as proteínas P1₃₉₋₅₁₂ e P1_{39-512d} por meio de *Western blot*. O procedimento foi repetido até que nenhuma reação fosse detectada.

3.23 ELISA para detecção de anticorpos específicos contra as proteínas P1, P1₃₉₋₅₁₂ e P1_{39-512d}

O nível de anticorpos específicos nos soros foi determinado por ensaio de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e titulação em placas de 96 poços MaxiSorp (Nunc) recobertas com as proteínas recombinantes truncadas ou a proteína P1 completa (CG14). Cada proteína testada foi diluída em PBS 1X (100 ng/poço), colocada nas placas e mantidas a 4 °C por 16 horas. As placas foram lavadas duas vezes com PBS-Tween 0.05% e então bloqueadas com PBS-Tween-Leite 5% por 2 horas a 37 °C. Os anticorpos específicos diluídos em série (1:2) iniciando em 1:25 foram adicionados aos poços e incubados por mais 2 horas a 37 °C. Após uma segunda lavagem, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) na diluição 1:3,000 foi adicionado as placas e seguiu-se nova incubação. Após a lavagem final, as placas foram reveladas com tampão Citrato de sódio (pH 5.8) contendo OPD, 12% H₂O₂ e a reação foi parada com adição de 50 µl de H₂SO₄ 2 M. A absorbância foi mensurada a 492 nm em leitora de placa (LabSystem). Todas as amostras foram testadas em duplicata. O valor de absorbância do soro pré-imune foi usado como branco. As

curvas de diluição foram feitas para cada amostra e os títulos foram calculados como logaritmos da maior diluição com densidade óptica superior a 0.05.

3.24 Imunofluorescência do *S. mutans*

O ensaio de imunofluorescência foi realizado segundo o protocolo descrito por Homonylo-McGavin e Lee (1996). Inicialmente, as linhagens PC3370 (Δ P1) e PC3370C de *S. mutans* crescidas foram preparadas por meio de lavagens com PBS 1X e ressuspensão em 1 ml de PBS 1X. As bactérias preparadas (100 μ l) foram espalhadas em lâminas de vidro e fixadas por aquecimento. Depois, as lâminas foram bloqueadas com BSA 3% por 30 min à temperatura ambiente. Então, foi adicionado 20 μ l de soro (anti-P1, anti-P1₃₉₋₅₁₂ ou anti-P1_{39-512d}) diluído (1: 500) e este complexo foi incubado por 30 min à 37 °C, posteriormente a lâmina foi intensamente lavada com PBS. Após este procedimento, o segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado ao FITC (isotiocianato de fluoresceína) foi adicionado e incubado ao abrigo da luz por 30 min à 37 °C, seguiu-se novas lavagens e as células marcadas foram observadas em microscópio invertido epifluorescente Nikon TE300 (495-nm excitação, 525-nm emissão).

3.25 Ensaio de inibição da agregação do *S. mutans* mediada por saliva livre por meio de anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂

Inicialmente clarificamos por centrifugação (14.000 rpm, 15 min à 4 °C) a saliva de um único doador segundo protocolo descrito por Rundegren e Arnold (1987). Os ensaios de agregação de *S. mutans* e inibição em presença de diferentes soros foram baseados no protocolo descrito por Brady et al. (1992) com algumas modificações. Assim, as células de *S. mutans* PC3370 (controle negativo) e PC3370C crescidas foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas para um D.O_{600nm} igual a 1. Para o ensaio de agregação, 100 μ l desta suspensão bacteriana juntamente com 50 μ l PBS 1X, 50 μ l de saliva clarificada diluída em tampão 50 μ l de KPBS foram

misturadas e aplicadas a poços de placas de microtitulação. Este conjunto foi incubado por 5 min à 37 °C para estabilização e depois, a absorbância foi mensurada em um leitora de placas de ELISA (LabSystem) originando a absorbância no tempo 0 (T0). Em seguida, a placa foi incubada por mais 60 minutos e a absorbância foi mensurada, resultando no valor T60. A taxa de agregação das cepas foi determinada usando a equação: $\Delta Abs_{600nm} = [T0 - T60]$.

Para o ensaio de inibição da agregação foram misturados 133 µl de suspensão bacteriana, 50 µl PBS com os anticorpos devidamente diluídos e 2 µl de $CaCl_2$ 1 M, estes foram colocados em poços de microtitulação e incubados por 30 min à 22 °C. Posteriormente, foi adicionada a saliva clarificada diluída em KPBS e o conjunto foi incubado por 5 min à 37 °C e a D.O no tempo 0 foi determinada. Depois, a placa foi incubada por mais 60 minutos e a D.O foi mensurada novamente. A inibição da agregação bacteriana foi estimada por meio do cálculo: $100 - [(\Delta Abs_{600nm} \text{ S. mutans incubado com soro} \times 100) / \Delta Abs_{600nm} \text{ S. mutans sem soro}]$. Apenas os soros da última dose de todos os grupos foram utilizados nos ensaios. Todos os testes foram repetidos três vezes independentemente.

3.26 Bloqueio da adesão de *S. mutans* à SAG imobilizada por anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ em placa de microtitulação

Para o ensaio de adesão foi empregado o protocolo descrito por Jakubovics et al. (2005). Assim, a saliva clarificada diluída em KPBS (100 µl/ poço) foi colocada em poços de placas de microtitulação (96 poços) e incubada por uma noite à 4 °C. A saliva foi removida e os poços lavados uma vez com TBSC (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl; pH 7.6 e 5 mM $CaCl_2$), bloqueados com BSA 1% por 1 hora à temperatura ambiente. Depois, os poços foram lavados duas vezes com TBSC e 100 µl da suspensão bacteriana ($D.O_{600nm} = 1$) foi adicionada aos poços e incubada à 37 °C por 2 horas. Então, os poços foram lavados com TBS e as células aderentes foram fixadas com formaldeído 25% por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada com TBS e as células foram marcadas com cristal violeta 0.5% por 1 min à temperatura ambiente. Por fim, a placa foi lavada com TBS e o corante

remanescente foi diluído em ácido acético 7%, e a absorbância de cada amostra foi determinada em leitor de placa de ELISA (D.O_{600nm}). Para os ensaios de inibição da adesão, inicialmente as células preparadas foram incubadas com os soros anti-P1₃₉₋₅₁₂, anti-P1_{39-512d}, anti-P1 (controle positivo), anti-P1 adsorvido com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ ou com a proteína P1_{39-512d}, em diferentes diluições, estes foram mantidos por 30 minutos à 37 °C, e depois adicionados a placa revestida com a saliva. O número de células ligadas com e sem os soros foram calculados a partir de uma curva padrão que relaciona o número de células de *S. mutans* e a D.O_{600nm}. Como controle positivo para a reação de inibição foi empregado também EDTA (3 mM), pois a ligação entre a P1 e a gp340 é cálcio dependente (CROWLEY et al., 1993). Apenas os soros da última dose de todos os grupos foram utilizados no ensaio. Como controle negativo foi empregado o soro pré-imune e a linhagem nocaute na proteína P1 (PC3370). Os experimentos foram repetidos três vezes de forma independente.

3.27 Imunogenicidade da proteína P1₃₉₋₅₁₂ em associação com diferentes adjuvantes - Protocolo vacinal

Cinco animais Balb/c fêmeas (6-8 semanas de idade) por grupo foram submetidos ao protocolo vacinal com 3 doses subcutâneas com intervalo de 15 dias entre elas. Foi usado 10 µg da proteína P1₃₉₋₅₁₂ purificada (dose/animal) e quando presente os adjuvantes foram usados nas concentrações de (dose/animal): 12.5 µg de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃), 1 µg de LTK4R e 5 µg de flagelina recombinante (FliCi). O grupo controle foi submetido ao mesmo protocolo vacinal, mas foram tratados com PBS.

3.28 Coleta de amostras

As amostras de soro, saliva e fezes foram colhidas um dia antes da primeira dose (amostras pré-ímmunes), no dia anterior a cada nova dose, duas semanas após a última dose e duas coletas adicionais no dia 60 e 112. O sangue foi coletado por

punção submandibular e preparado conforme descrito na seção 3.20. As amostras de fezes foram pesadas e diluídas em PBS para a concentração final de 1 mg/ml, depois centrifugadas e o sobrenadante armazenado. A saliva foi recolhida após a injeção intraperitoneal (i.p) de 200 µl de 100 µg de pilocarpina para estimular o fluxo de saliva. As amostras de saliva foram centrifugadas (10.000 rpm, 30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante separado. Foi adicionado 1 mM de PMSF às amostras de saliva, como um inibidor de protease . Todas as amostras foram armazenadas à -80 ° C até sua utilização.

3.29 ELISA para detecção de anticorpos específicos contra a proteína P1₃₉₋₅₁₂

O nível de anticorpos específicos nos soros foi determinado por ensaio de ELISA e titulação em placas de 96 poços MaxiSorp (Nunc) recobertas com a proteína alvo, P1₃₉₋₅₁₂. As placas foram recobertas com a proteína alvo diluída em PBS 1X (100 ng/poço) a 4 °C por 16 horas. O procedimento foi realizado conforme descrito na seção 3.23. Todas as amostras foram testadas em duplicata. O valor de absorbância do soro dos animais imunizados com PBS foi usado como branco. As curvas de diluição foram feitas para todas as amostras e as concentrações de anticorpos específicos foram determinadas empregando uma curva padrão gerada com uma solução de IgG ou IgA comercial quantificado (Sigma Aldrich).

3.30 ELISA de avides

A avides dos anticorpos gerados foi determinada por meio de ELISA com eluição por tiocianato de amônia (BARGIERI et al., 2007). O procedimento foi similar ao descrito no ELISA para quantificação de anticorpos apenas com a inclusão de um passo extra. Assim, após a incubação com os anticorpos primários (todos os soros foram normalizados para a D.O_{492nm} igual a 1) e lavagem das placas, concentrações crescentes de 0 a 8 M de tiocianato de amônio fresco foi diluído em PBS e adicionado aos poços. A concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar 50%

dos anticorpos ligados foi determinada. A porcentagem de ligação foi calculada seguindo a fórmula: $[(D.O_{492nm} \text{ na presença de tiocianato de amônia} \times 100) / D.O_{492nm} \text{ na ausência de tiocianato de amônia}]$. Para esse ensaio apenas os soros da 3ª dose foram testados e os ensaios foram repetidos duas vezes de forma independentes.

3.31 Reatividade dos soros policlonais anti-P1₃₉₋₅₁₂ com os fragmentos da proteína P1 por meio de ELISA

Os anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ gerados em associação com os adjuvantes foram avaliados quanto a suas capacidades de reconhecer a proteína P1 nativa e os fragmentos da P1 em ensaio de ELISA. Placas de ELISA foram recobertas com a bactéria completa NG8 preparada ou 200 ng/poço das proteínas purificadas (CG14, MA41, LT1, NR5) em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9.6). As proteínas na forma desnaturada foram obtidas após tratamento térmico (100 °C, 10 minutos) e para a bactéria completa NG8 após 5 minutos à 42 °C. Os soros apenas da 3ª dose foram adicionados aos poços e diluições seriadas (1:2) foram realizadas. A reatividade foi feita usando anti-IgG de camundongo marcados com peroxidase. O procedimento seguiu protocolo descrito anteriormente. Todas as amostras testadas foram analisadas em duplicata. O valor de absorbância do soro do grupo imunizado com PBS foi utilizado como referência de branco. As curvas de diluições foram elaboradas para cada amostra. As amostras foram testadas em duplicatas. Os títulos finais de reatividade foram calculados como o valor da maior diluição com densidade óptica superior a 0.05.

3.32 Inibição da adesão de *S. mutans* ao SAG imobilizado por anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ específicos utilizando o sistema de BIAcore

A inibição da adesão de *S. mutans* NG8 ao SAG imobilizado em SPR (BIAcore) com os soros produzidos com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada aos adjuvantes foram feitos seguindo o protocolo descrito por Oli et al. (2005). Os soros policlonais foram

usados nas diluições: 1:25 e 1:100. A variação na unidade de ressonância (ΔRU) foi empregada para calcular a porcentagem de inibição da adesão (inibição da adesão = $100 - [(\Delta RU \text{ do } S. \textit{mutans} \text{ NG8 incubado com o soro teste } \times 100) / \Delta RU \text{ do } S. \textit{mutans} \text{ NG8}]$). O soro de animais imunizados com PBS foi usado como controle e subtraído dos valores finais de inibição. Apenas os soros da 3ª dose de todos os grupos foram utilizados no ensaio. Os valores finais representam resultados de três ensaios independentes realizados em duplicata.

3.33 Inibição da agregação de *S. mutans* ao SAG livre por meio de espectrofotometria

A inibição da agregação de *S. mutans* NG8 ao SAG livre foi realizada segundo o protocolo descrito por Brady et al. (1992). Os soros policlonais foram usados nas diluições: 1:100. A variação na absorvância (ΔAbs_{600nm}) foi empregada para calcular a porcentagem de inibição da agregação (inibição da agregação = $100 - [(\Delta Abs_{600nm} \text{ do } S. \textit{mutans} \text{ NG8 incubado com o soro teste } \times 100) / \Delta Abs_{600nm} \text{ do } S. \textit{mutans} \text{ NG8}]$). O soro de animais imunizados com PBS foi usado como controle e subtraído dos valores finais de inibição. Apenas os soros da 3ª dose de todos os grupos foram utilizados no ensaio. Os valores finais representam resultados de três ensaios independentes realizados em duplicata.

3.34 Ensaio de deposição da proteína C3 do complemento

Os ensaios de ligação e deposição do complemento seguiram protocolo descrito por Darrieux et al. (2007). Inicialmente, os soros foram avaliados quanto as suas capacidades de reconhecerem a proteína P1 nativa expressa na superfície do *S. mutans*. A linhagem UA159 de *S. mutans* foi crescida em THY até atingir a $D.O_{600nm}$ de 0.5, depois foi lavada 1X com PBS, ressuspendida em igual volume de PBS. Em seguida, a bactéria foi incubada por 30 minutos a 37 °C com o *pool* dos soros (3ª dose) dos animais imunizados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada aos diferentes

adjuvantes. Após nova lavagem a bactéria foi incubada com 100 µl de anti-IgG de camundongo conjugado ao FITC (MP Biomedicals) diluído 1:2,000. Por fim, as amostras foram analisadas em FACScalibur (BD Biosciences).

Para o ensaio de deposição de complemento os soros foram inativados por incubação à 56 °C por 30 minutos. As bactérias preparadas, como descrito anteriormente, foram incubadas com os soros na diluição 1:100 (todos normalizados para concentração de 1.2 µg/ml) por 30 minutos a 37 °C. Após lavagem as bactérias foram ressuspensas em 90 µl de gelatina veronal (Sigma Aldrich) e incubadas na presença de soro fresco de animais Balb/c (1:100) por 30 minutos a 37 °C. Após nova lavagem, as bactérias foram incubadas com 100 µl do anticorpo contra a proteína C3 do complemento de camundongos conjugado ao FITC (MP Biomedicals) na diluição 1:1,000 em gelo e no escuro. Por fim, as bactérias foram lavadas duas vezes com PBS, ressuspensa em 1% de formaldeído e analisado em FACScalibur (BD Biosciences). Como controle foi empregado o soro de animais imunizados com PBS (anti-PBS) e apenas os soros da 3ª dose foram avaliados. O ensaio foi repetido duas vezes de forma independente.

3.35 Construção das linhagens de *B. subtilis* capazes de expressar adesinas bacterianas na superfície dos esporos

Os genes que codificam para a proteína InvA completa de *Y. pseudotuberculosis* ou para sua região de ligação (Inv600), e a região ligadora da proteína da camada S de *L. brevis* (SlpA), foram fusionados com o gene que codifica para a região N-terminal da proteína CotB da capa dos esporos de *B. subtilis* e seu promotor constitutivo (PcotB). Inicialmente, o gene que codifica para o promotor da CotB e sua região N-terminal (275 resíduos de aminoácidos) foram amplificados usando os iniciadores CotB5 e CotB3 (Quadro 3). O produto de PCR (831 pb) foi clonado no vetor pDG1731, previamente clivados com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, o vetor originado foi denominado pDGcotB (Quadro 2). O gene *slpA* foi amplificado do DNA genômico de *L. brevis* usando os iniciadores SlpAFw e SlpARv (Quadro 3). O gene que codifica para a InvA completa foi amplificado do DNA genômico da *Y.*

pseudotuberculosis usando os iniciadores InvAFw e InvA3, enquanto o fragmento de DNA que codifica para a região ligadora localizada na porção C-terminal da InvA, denominada *inv600*, foi obtida com os iniciadores InvA5 e InvA3 (Quadro 3). Os produtos de PCR amplificados (662 pb para *slpA*, 2.9 kb para *invA* e 582 pb para *inv600*) foram digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI* e clonado no vetor pDGcotB previamente preparado (manuscrito). Os vetores integrativos construídos foram denominados de pSlpA, pInvA e pInv600, respectivamente (Quadro 2). As construções foram confirmadas por sequenciamento. Os vetores construídos foram introduzidos no genoma do *B. subtilis* 1012 por meio de dupla recombinação no gene não essencial da treonina sintase (*thrC*), as linhagens transformadas foram denominadas BsSlpA, BsInvA e BsInv600, respectivamente (Quadro 1).

3.36 Construção do vetor vacinal pLDV702 de *B. subtilis*

A construção do vetor vacinal pLDV702 foi obtido por meio da subclonagem do gene *spaP1N* no vetor pHCMC03 de *B. subtilis* (PHAN; NGUYEN; SCHUMANN, 2006) e foi iniciada com a obtenção do fragmento de interesse por meio de dupla digestão com as enzimas *BamHI* e *AatII*, assim como a digestão dos vetores com as mesmas enzimas. As reações foram feitas com 200 ng de vetor, 1X tampão enzimático, 1 unidade de *BamHI*, 1 unidade de *AatII* e H₂O q.s.p 50 µl, a digestão foi mantida por 2 horas a 37 °C. Após este período, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0.8% e as bandas correspondentes aos fragmentos de interesse foram excisados, e purificados com kit GFX segundo instruções do fabricante. Os produtos purificados confirmados e quantificados foram ligados empregando a reação com 150 ng de inserto, 50 ng de vetor, 1 unidade de T4 DNA ligase, 1X tampão enzimático, 1X PEG 4000 e H₂O milli-Q q.s.p 10 µl. A reação foi incubada por 1 hora a 22 °C e depois por uma noite a 4 °C. A mistura de ligação foi transformada em linhagem competente de *E. coli* K12 DH5α. As colônias que cresceram em meio seletivo foram isoladas e submetidas a extração de DNA plasmidial, seguida de análise de restrição com as correspondentes enzimas e visualização em gel de agarose. O vetor vacinal construído foi denominado de

pLDV702 (Quadro 2). O vetor pLDV702 foi transformado nas linhagens de *B. subtilis* BsSlpA, BsInvA e BsInv600, originando as linhagens LDV703, LDV704, LDV705, respectivamente. O vetor pLDV702 também foi transformado na linhagem parental de *B. subtilis* 1012, e originou a linhagem LDV702 (Quadro 1).

3.37 Preparo dos esporos de *B. subtilis*

Para a obtenção dos esporos empregamos o seguinte protocolo de cultivo e purificação desenvolvido em nosso laboratório. Uma cultura crescida por 16 horas das linhagens de *B. subtilis* foi adicionada ao meio líquido Foerster (FOERSTER; FOSTER, 1966) contendo cloranfenicol (30 µg/ml), estas foram incubadas por 10 dias à 37 °C com agitação constante. Após o cultivo as amostras foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com H₂O destilada. Para a imunização oral, os esporos foram ressuspensos em solução de bicarbonato de sódio (0.5 M), enquanto para as imunizações nasal e sublingual, os esporos foram ressuspensos em tampão PBS (salina tamponada com fosfato). As concentrações de esporos e células vegetativas viáveis foram determinadas pelo plaqueamento das diluições seriadas das amostras com e sem tratamento térmico (60 minutos a 65 °C) em meio LB com cloranfenicol. Nas condições avaliadas, nenhuma contaminação por células vegetativas foi observada.

3.38 Extração e detecção das proteínas recombinantes da capa dos esporos

As proteínas de capa dos esporos de *B. subtilis* foram extraídas após incubação dos esporos (~ 10⁹ esporos) com tampão de extração (50 mM de ditioneitol (DTT), 1% SDS) a 70 °C por 30 minutos. Os esporos foram centrifugados (10.000 rpm, 10 minutos) e o sobrenadante foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blot* com anticorpos anti-SlpA, produzido em nosso laboratório, e anti-InvA (gentilmente cedido pelo Dr. Vasco Azevedo, da

Universidade Federal de Minas Gerais). Amostras reativas foram reveladas com kit de quimio luminescência (Pierce) e expostas em filme fotográfico.

3.39 Detecção e quantificação da expressão *in vitro* da P1₃₉₋₅₁₂ nas linhagens vacinais de *B. subtilis*

Para determinar a expressão e quantidade do antígeno P1₃₉₋₅₁₂ que as linhagens vacinais LDV702 (parental), LDV703, LDV704 e LDV705 expressaram após indução por temperatura *in vitro*, foi realizado um ensaio de imunodetecção com marcação pelo anticorpo anti-P1₃₉₋₅₁₂d. Inicialmente, as linhagens foram submetidas ao crescimento em meio de cultura LB com cloranfenicol (30 µg/ml) à 37 °C com agitação até a D.O ideal de 0,6 – 0,8, neste momento as culturas foram induzidas por 3,5 horas a 48 °C (*PgsiB*). Após indução, 1 ml de amostra foi coletada e a D.O foi medida. Esse material foi centrifugado a 7.000 rpm por 5 minutos, o precipitado foi separado e foi lisado como descrito anteriormente. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 12.5% e posterior ensaio de *Western blot*.

Além disso, as amostras foram submetidas ao ensaio de *dot blot* no qual foram aplicadas concentrações celulares decrescentes (10^7 à 10^2 ufc de *B. subtilis*) em membrana de nitrocelulose, assim como a proteína P1₃₉₋₅₁₂ purificada de *B. subtilis* (250 à 3,2 ng) utilizada como parâmetro para a quantificação do antígeno. As amostras foram submetidas ao ensaio de imunodetecção empregando o soro anti-P1₃₉₋₅₁₂d. As bandas reativas foram detectadas por kit de quimio luminescência e analisadas usando o software ImageJ, segundo instruções do fabricante.

3.40 Imunofluorescência dos esporos

Os esporos de *B. subtilis* foram fixados diretamente em lâminas conforme protocolo utilizado por Duc et al. (2003). Os esporos foram ressuspensos em tampão GTE-lisozima (50 mM glicose, 20 mM Tris HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 2

mg/mL de lisozima) e aplicados diretamente em lâminas tratadas com solução 0.01% de poli-L-lisina (Sigma Aldrich). Depois de 5 minutos, o líquido foi aspirado e deixado para secar completamente em temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram lavadas com PBS 1X e bloqueadas por 30 minutos com 2% soro albumina bovina diluída em PBS. As amostras foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpos específicos para as proteínas SlpA ou InvA, lavadas três vezes e incubadas com anticorpos anti-IgG conjugados a FITC. Após essas etapas, as lâminas foram montadas com lamínulas e submetidas à análise em microscópio invertido epifluorescente Nikon TE300 (495-nm excitação, 525-nm emissão).

3.41 Adesão dos esporos recombinantes de *B. subtilis* a células Caco-2 *in vitro*

A aderência dos esporos recombinantes de *B. subtilis* a células intestinais foi realizada utilizando a linhagem celular humana de carcinoma do cólon Caco-2 (ATCC número HTB37), de acordo com procedimento previamente descrito por Dramsi et al. 1995. As células Caco-2 foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 2 mM de L-glutamina e 20% de soro fetal bovino por duas semanas. Depois, os esporos foram adicionados as placas de 24 poços (Nunc) contendo 2×10^5 células Caco-2/poço a uma concentração de 5×10^9 esporos/poço. O ensaio foi realizado com meio contendo gentamicina (20 µg/mL) para inativar os esporos germinados. Após 2 horas, os poços foram lavados para remover os esporos não ligados, e as células Caco-2 foram lisadas com uma solução contendo 0.2% Triton X-100. As amostras lisadas foram aquecidas a 65 °C durante 60 minutos e plaqueadas em LB com cloranfenicol (30 µg/ml). O número de esporos aderidos foi determinado por contagem das unidades formadoras de colônias nas placas após 24 horas de crescimento a 37 °C. O experimento foi repetido três vezes de forma independente. As amostras foram avaliadas em duplicata.

3.42 Disseminação dos esporos no intestino de camundongos

Grupos de cinco camundongos Balb/c foram inoculados com uma dose única de 10^{11} esporos para cada linhagem recombinante de *B. subtilis* testados. Os camundongos foram mantidos em gaiolas durante um período de 9 dias. Cada dia, os animais em grupo foram transferidos para gaiolas limpas sem maravalha durante 2 horas. Após este período, as fezes foram colhidas, pesadas e diluídas em 5 ml de PBS 1X. As amostras foram centrifugadas (8.000 rpm, 15 minutos, 4 °C) e o sobrenadante foi separado. O sobrenadante foi diluído em série com PBS e semeado, antes e depois do tratamento térmico (60 minutos, 65 °C) em placas de LB suplementadas com espectinomicina (100 µg/ml) e cloranfenicol (30 µg/ml). O número de esporos e de células vegetativas viáveis por grama de fezes foi determinado usando a seguinte fórmula: [(ufc/ml X 50) / peso das fezes recolhidas]. Assim, o número total de esporos e células excretadas em cada dia representa a média do grupo (n=5).

3.43 Adesão dos esporos de *B. subtilis* às placas de Peyer de camundongos

Grupos de quatro camundongos Balb/c fêmeas foram inoculados com 5×10^9 esporos/animal. Após o período de 1 ou 6 dias os animais (n=2) foram submetidos a eutanásia e o intestino retirado assepticamente. O intestino foi limpo em salina estéril e as placas de Peyer identificadas foram removidas, lavadas e processadas com solução de 0.2% Triton X-100. O lisado foi plaqueado em meio LB suplementado com espectinomicina (100 µg/ml) e cloranfenicol (30 µg/ml), antes e depois de tratamento térmico (65 °C, 1 hora), para a determinação das unidades formadoras de colônias. Os resultados representam a média (\pm SD) de dois ensaios repetidos independentemente.

3.44 Regime vacinal com esporos recombinantes de *B. subtilis* e processamento das amostras

Para a imunização oral, grupos de cinco animais Balb/c fêmeas, com 6-8 semanas de idade, foram inoculados com esporos das diferentes linhagens de *B. subtilis*. Os camundongos foram imunizados com 5×10^{10} esporos nos dias 1, 2, 3, 15, 16, 17, 29, 30 e 31. Para imunizações nasal e sublingual, grupos de 10 animais, com 6-8 semanas de idade, foram inoculados com esporos das linhagens de *B. subtilis* 1012, LDV702 e LDV704 nos dias 1, 15 e 30. Para as imunizações nasais, os animais receberam uma dose de 10^8 esporos em um volume de 10 μ l nas narinas. Para as imunizações sublinguais, os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (8 mg/kg de peso corporal) e inoculados com uma dose de 10^8 esporos em um volume de 10 μ l por baixo da língua. Amostras de soro e saliva foram recolhidas um dia antes da administração da primeira dose (pré-ímmunes amostras) e no dia antes de cada novo conjunto de doses. A saliva foi recolhida após a injeção intraperitoneal (i.p) de 0.5 ml de 0.2% de pilocarpina para estimular o fluxo de saliva. As amostras de saliva foram centrifugadas (10.000 rpm, 30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante separado. Foi adicionado 1 mM de PMSF às amostras de saliva (JIA et al., 2004). Todas as amostras foram armazenadas a - 80 °C.

3.45 Detecção das respostas antígeno-específicas de anticorpos séricos e de mucosa

Os níveis de anticorpos IgA e IgG específicos anti-P1₃₉₋₅₁₂ no soro e saliva foram determinados por meio de ELISA. Microplacas de 96-well MaxiSorp (Nunc) foram revestidas com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ (100 ng/poço) e submetidas a protocolo padrão de ELISA. Todas as amostras testadas foram analisadas em duplicata. Os valores de absorvância do soro anti-PBS foi utilizado como referência de branco. As curvas de diluições foram elaboradas para cada amostra e a concentração de

anticorpos específicos foram determinadas empregando uma curva padrão gerada com uma solução de IgG ou IgA comercial quantificado (Sigma Aldrich).

3.46 Inibição da agregação de *S. mutans* mediada pela SAG livre em placas de microtitulação

A inibição da agregação do *S. mutans* NG8 à SAG livre na presença dos soros anti-P1₃₉₋₅₁₂ gerados foi realizado como descrito na seção 3.33. Os soros de animais imunizados com esporos da linhagem 1012 de *B. subtilis* foram utilizados como controles e os valores detectados foram retirados dos resultados obtidos com animais imunizados com esporos recombinantes. Os soros testados foram àqueles referentes à 3ª dose de imunização e todos foram diluídos para uma concentração final de 2 µg/ml. A inibição da agregação do *S. mutans* NG8 na presença dos soros imunes foram calculadas seguindo a fórmula: $100 - [(\Delta\text{Abs}_{600\text{nm}}$ do *S. mutans* NG8 incubado com a amostra do soro testado x 100)/ $\Delta\text{Abs}_{600\text{nm}}$ do *S. mutans* NG8]. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos independentemente pelo menos três vezes.

3.47 Inibição da adesão de *S. mutans* mediada pelo SAG ligado em placa de microtitulação

A inibição da adesão do *S. mutans* NG8 à SAG ligada a superfícies abióticas na presença dos soros anti-P1₃₉₋₅₁₂ gerados foi realizado como descrito na seção 3.26. Os soros de animais imunizados com esporos da linhagem 1012 de *B. subtilis* foram utilizados como controles e os valores detectados foram retirados dos resultados obtidos com animais imunizados com esporos recombinantes. Todos os soros testados foram àqueles referentes à 3ª dose de imunização e todos foram diluídos para uma concentração final de 2 µg/ml. A inibição da adesão do *S. mutans* NG8 na presença dos soros imunes foram calculadas seguindo a fórmula: $100 - [(\text{Abs}_{600\text{nm}}$ do *S. mutans* NG8 incubado com a amostra do soro testado x 100)/ $\text{Abs}_{600\text{nm}}$

do *S. mutans* NG8 sem soro]. Os testes foram realizados em triplicata e repetidos independentemente pelo menos três vezes.

3.48 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados com o programa GRAPHPAD PRISM 5 e foram expressos como a média \pm SD. Diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$) para o ensaio de adesão as células Caco-2 foram determinados pelo teste de *Student's t*. Os ensaios de inibição da adesão e da agregação de *S. mutans*, e as respostas imunológicas foram analisadas com one-way ANOVA e *Bonferroni* posttest. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

4 RESULTADOS

4.1 Capítulo I. Produção e caracterização funcional e imunológica da proteína P1₃₉₋₅₁₂ produzida a partir de uma linhagem recombinante de *B. subtilis*

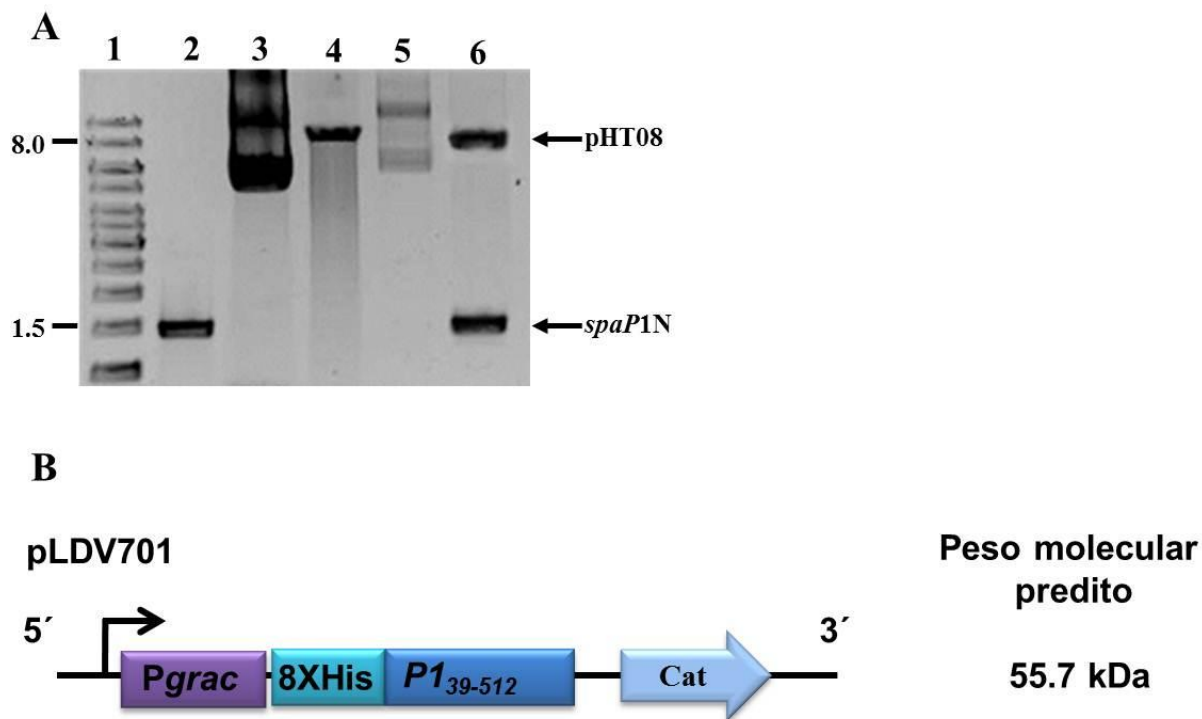
4.1.1 Construção da linhagem recombinante de *B. subtilis* LDV701, expressão e purificação da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂

Iniciamos o trabalho amplificando o gene *spaP1N* que codifica para a proteína P1₃₉₋₅₁₂ usando como molde o DNA genômico da cepa UA159 de *S. mutans*. Na análise eletroforética da reação de PCR foi identificada apenas um fragmento de tamanho aproximado de 1.4 kb, correspondente ao gene *spaP1N* (figura 2A). Em seguida, o gene *spaP1N* foi clonado no vetor pGEM-T-easy (Promega) e posteriormente subclonado no vetor final de expressão pHT08 usando pontas coesivas (*Bam*HI e *Aat*II) originando o vetor pLDV701 (figura 2A e 2B). Todas as construções foram confirmadas por análise de restrição e sequenciamento. O vetor pLDV701 codifica para a proteína P1₃₉₋₅₁₂ sob o controle de um promotor induzível por IPTG (Pgrac), conforme demonstrado na figura 2B.

A proteína codificada tem uma massa molecular predita de 55.7 kDa, mas uma banda de aproximadamente 50 kDa, detectada em geis de poliacrilamida em condição desnaturante, nos extratos da linhagem de *B. subtilis* LDV701. A proteína foi reativa com o soro anti-P1. A diferença entre a massa molecular predita e a identificada para a proteína P1₃₉₋₅₁₂ já foi descrita em outros trabalhos que usaram a região SBR e está relacionada à presença de muitas repetições do aminoácido alanina nessa região (VAN DOLLEWEERD; CHARGELEGUE; MA, 2003). O soro policlonal anti-P1 foi reativo com uma proteína de 185 kDa na amostra de *S. mutans* PC3370C (controle positivo) correspondente à proteína P1 nativa. Nenhuma reação inespecífica foi observada entre o soro anti-P1 e a cepa nocaute para a P1 (PC3370), nem com os extratos totais do *B. subtilis* LDV700 (pHT08 vazio) ou com a linhagem LDV701 sem indução (figura 3A). A proteína recombinante foi acumulada no citoplasma do *B. subtilis* LDV701 sendo que aproximadamente metade da proteína

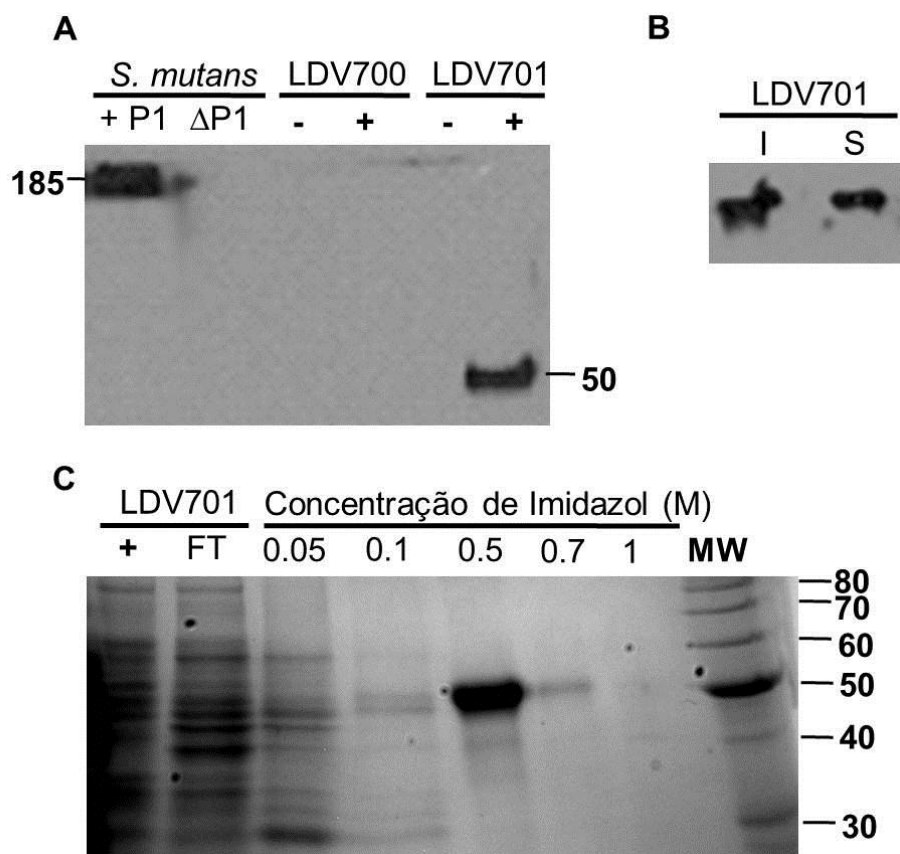
expressa encontrava-se na forma solúvel (figura 3B). Para a etapa de purificação foi utilizada apenas a fração solúvel do extrato induzido da linhagem LDV701 e a maior concentração da proteína P1₃₉₋₅₁₂ foi eluída com 0.5 M de Imidazol (figura 3C). O rendimento final foi calculado para aproximadamente 15 mg/L de proteína solúvel em cultura induzida à 37 °C por 4 horas.

Figura 2- Construção do vetor de expressão e purificação da proteína P1₃₉₋₅₁₂ em *B. subtilis* (pLDV701).



(A) Amplificação do gene *spaP1N* por PCR e construção do vetor pLDV701. 1- Marcador de massa molecular 1 kb; 2- Fragmento amplificado *spaP1N* (1.4 kb) derivado do gene *spaP*; 3- vetor pHT08 circular; 4- vetor pHT08 (7.9 kb) digerido com *Bam*HI e *Aat*II; 5- vetor pLDV701 circular; 6- vetor pLDV701 digerido com *Bam*HI e *Aat*II. (B) Representação esquemática do gene recombinante que codifica para a P1₃₉₋₅₁₂ clonado no vetor pLDV701. O peso molecular predito da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ está indicado à direita da figura.

Figura 3- Detecção e purificação da proteína P1₃₉₋₅₁₂ produzida em linhagem recombinante de *B. subtilis*.



(A) Imunodeteção da P1 ou P1₃₉₋₅₁₂ expressa pelas linhagens de *S. mutans* PC3370C ou de *B. subtilis* LDV701. Os controles negativos incluem as linhagens PC3370 (ΔP1) de *S. mutans*, o *B. subtilis* LDV700 (com o vetor pHT08 vazio) e o *B. subtilis* LDV701 não induzido. (B) Detecção da proteína P1₃₉₋₅₁₂ na fração solúvel (S) ou insolúvel (I) do *B. subtilis* LDV701 após indução com IPTG e fracionamento. (C) Purificação da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ expressa em linhagem recombinante de *B. subtilis*. As concentrações de imidazol usadas para a eluição da proteína da coluna estão indicadas (M, molaridade). Para os ensaios de *Western blots* foram usados o anticorpo anti-P1. O gel de SDS-PAGE 12,5% foi corado com comassie blue brilliant (CBB). MW, marcador de peso molecular indicado em kilodaltons (kDa); (+), amostra após indução; (-), amostra sem indução; FT, amostra após passagem pela resina.

4.1.2 Reatividade dos monoclonais (mAbs) anti-P1 com as proteínas P1, P1₃₉₋₅₁₂ e os domínios funcionais da P1

Com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ purificada partimos para a caracterização desta como potencial antígeno vacinal. Como etapa inicial, caracterizamos as propriedades antigênicas empregando anticorpos monoclonais direcionados contra os domínios estruturais da P1 inclusos no antígeno alvo P1₃₉₋₅₁₂ (pré-A, região A e região V) (figura 4A e 4B). Avaliamos a capacidade dos mAbs anti-P1 em reconhecer a proteína P1₃₉₋₅₁₂ na forma solúvel ou desnaturada por fervura. Além disso, determinamos o perfil de reconhecimento desses com os diferentes fragmentos de P1 e a proteína nativa empregando também as proteínas na forma solúvel e desnaturada (figura 4, 5 e 6).

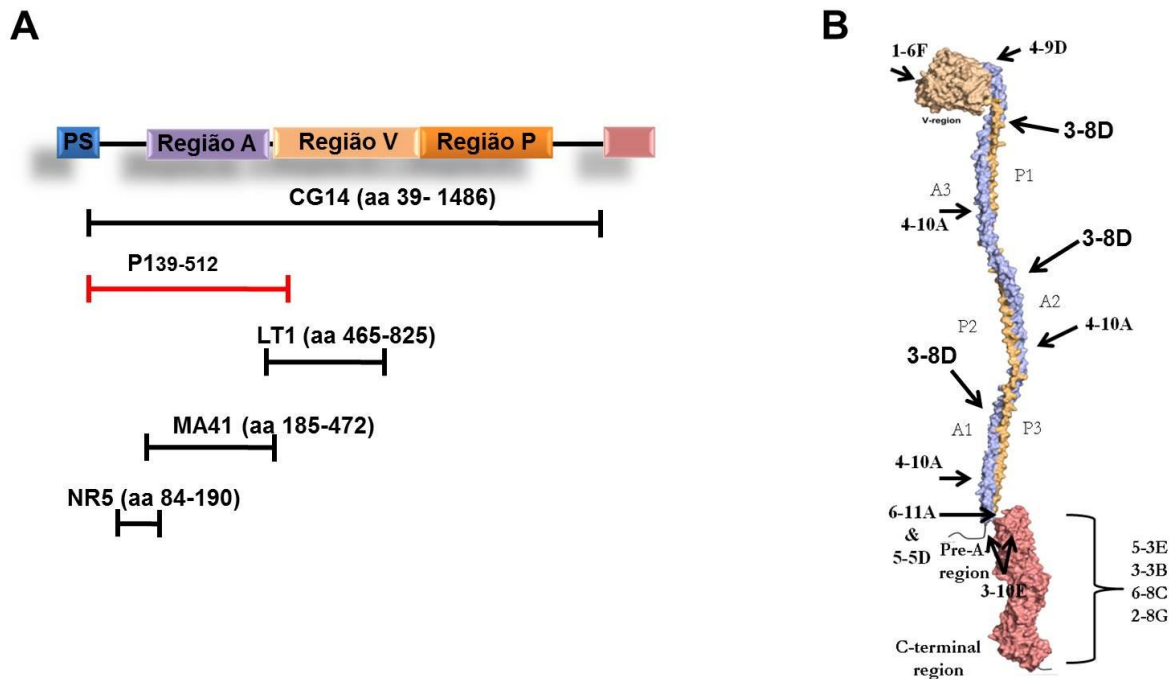
A proteína P1 nativa expressa em *S. mutans* NG8 é fortemente reconhecida pelos mAbs 1-6F, 4-9D e 4-10A, mas fracamente pelo mAb 3-8D. Quando a proteína é desnaturada o reconhecimento pelo mAb 3-8D e 4-9D é aumentado, provavelmente devido à exposição da região de ligação dos mAbs, enquanto os outros mAbs têm sua reatividade reduzida. A proteína P1 recombinante produzida em *E. coli* (CG14) apresenta o mesmo perfil de reatividade com os mAbs que a proteína nativa (figura 5). Os resultados sugerem que o epítipo para 1-6F e para 4-9D são conformacionais na proteína P1 nativa e recombinante, enquanto o epítipo reconhecido pelo mAb 3-8D é linear e parcialmente mascarado na proteína nativa.

A proteína MA41, que corresponde ao domínio funcional SBR, foi reconhecida apenas pelo mAb 3-8D e a desnaturação não alterou a reatividade com esse mAb, indicando que o epítipo reativo do mAb 3-8D é linear, exposto e está presente na proteína recombinante MA41 (figura 5). A proteína LT1, correspondente ao domínio V da proteína P1, foi reconhecida apenas pelo mAb 1-6F e sua reatividade foi perdida quando a proteína foi desnaturada, indicando que o epítipo reconhecido pelo mAb 1-6F é descontínuo (figura 5).

O antígeno vacinal P1₃₉₋₅₁₂ é reconhecido pelos mAbs 1-6F, 4-9D e 3-8D, porém a desnaturação por fervura elimina a reatividade frente aos mAbs 1-6F e 4-9D, mas não ao 3-8D (figura 6A e 6B). Esses dados indicam que os epítipos reconhecidos pelos mAbs 1-6F e 4-9D são conformacionais, enquanto que o epítipo

para o 3-8D é linear. Além disso, a desnaturação aumento a reatividade do mAb 3-8D com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ indicando que na proteína recombinante o epítipo reconhecido por esse mAb é críptico (Figura 6B). Conforme esperado a proteína P1₃₉₋₅₁₂ só foi reconhecida em *Western blot* pelo mAb 3-8D, o qual tem forte reatividade com a região A (Figura 6C). O conjunto de resultados sugere que a proteína P1₃₉₋₅₁₂ recombinante produzida e purificada a partir de *B. subtilis* preserva epítopos lineares e conformacionais importantes semelhantes aos identificados na proteína P1 nativa.

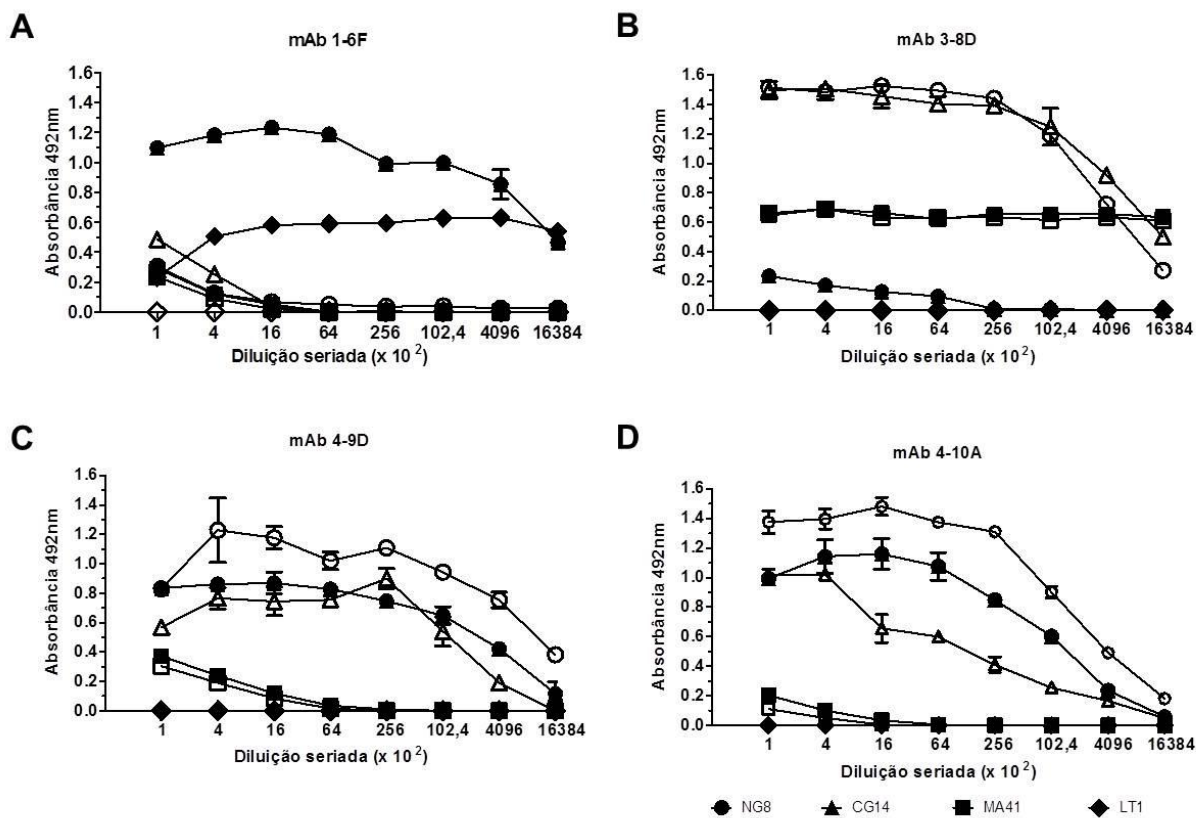
Figura 4- Representação esquemática das proteínas recombinantes derivadas da proteína P1 de *S. mutans* e distribuição dos anticorpos monoclonais (mAbs) anti-P1 na estrutura conformacional da proteína.



(A) Sequência primária da P1 com seus domínios relevantes e descrição dos fragmentos proteicos utilizados nos ensaios com suas respectivas posições. (B) Regiões de reconhecimento dos mAbs anti-P1 na proteína conformacional. PS, peptídeo sinal.

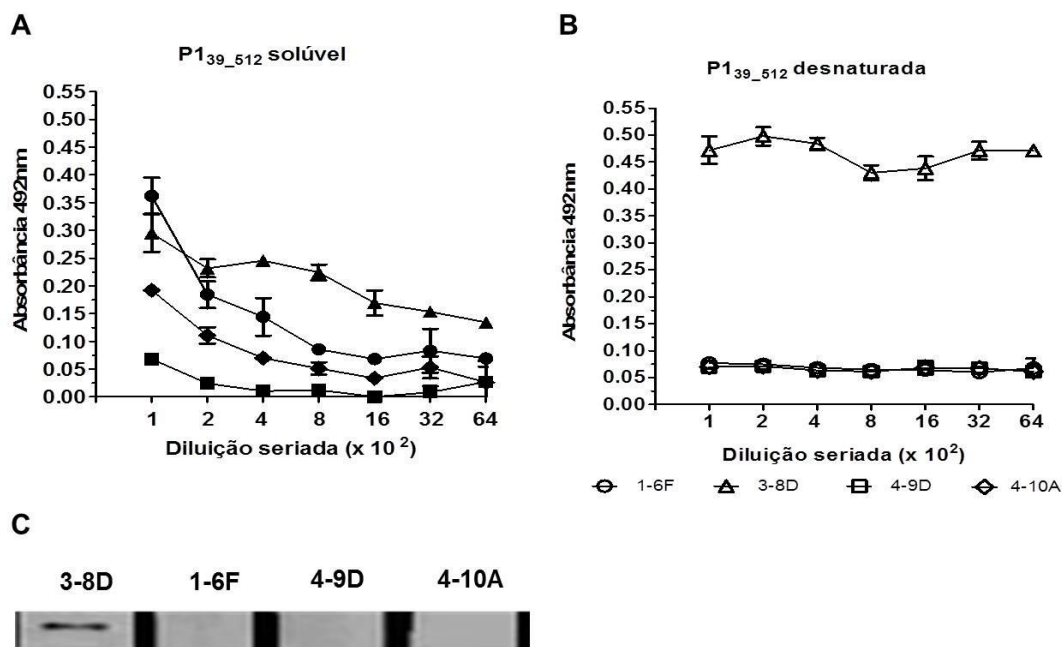
Fonte: Modificado de Larson et al. (2011).

Figura 5- Avaliação da reatividade dos mAbs anti-P1 com a proteína nativa expressa no *S. mutans* NG8 e com os fragmentos de proteína derivados da proteína P1.



As proteínas foram purificadas e usadas como antígeno de fase sólida em duas formas: solúvel (símbolo fechado) e desnaturado (símbolo aberto). Os mAbs selecionados têm epítomos caracterizados para as porções A, P e V. Os mAbs usados estão indicados na porção superior dos gráficos.

Figura 6- Caracterização dos epítomos da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ usando anticorpos monoclonais anti-P1.

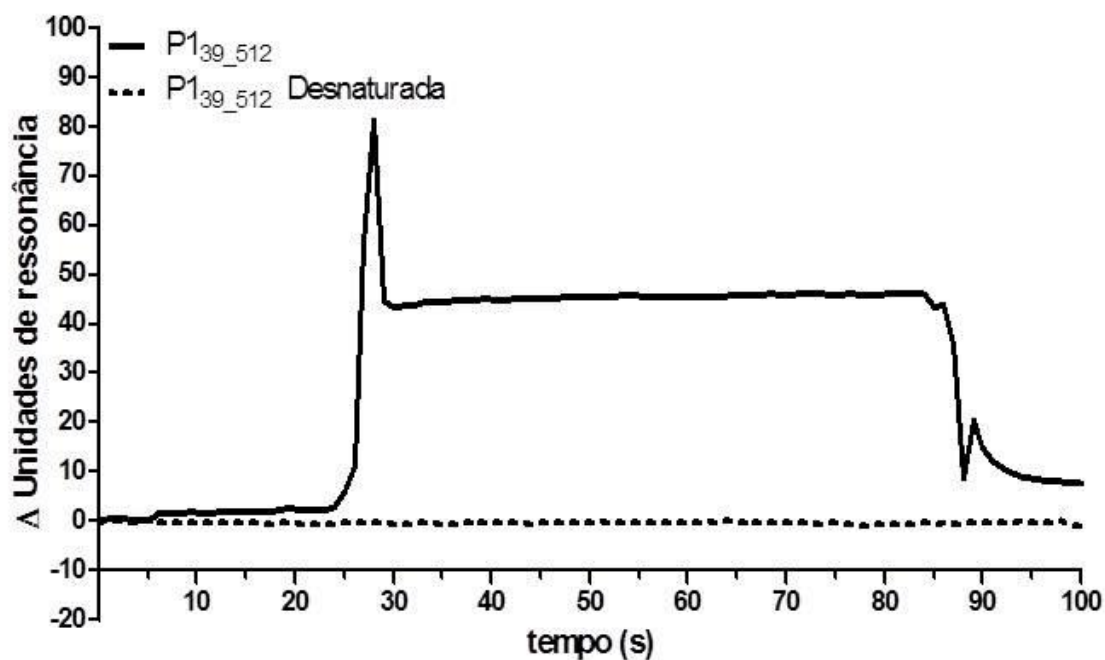


Reatividade dos mAbs anti-P1 com a proteína (A) P1₃₉₋₅₁₂ solúvel ou (B) desnaturada por fervura empregando ensaio de ELISA. (C) Imunodeteção da proteína P1₃₉₋₅₁₂ por meio de *Western blot* com mAbs anti-P1.

4.1.3 Ligação da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ produzida em *B. subtilis* LDV701 à SAG

Em seguida determinamos se a proteína P1₃₉₋₅₁₂ recombinante produzida em *B. subtilis* seria capaz de se ligar à SAG humana. Para isso usamos a proteína recombinante na forma solúvel ou desnaturada por fervura. Como pode ser observado na figura 7, o sensograma da proteína recombinante solúvel indica uma forte ligação à SAG (1 RU ~ 1 picograma/mm²) acompanhado por uma lenta dissociação, indicativo de aderência à superfície. Por outro lado, a proteína desnaturada não foi capaz de se ligar à SAG. Os resultados demonstram que a proteína recombinante produzida em *B. subtilis* preserva o sítio de ligação à SAG, a qual é termo-lábil e constituída por uma região descontínua. Além disso, com os dados anteriores de reatividade frente aos mAbs podemos inferir que o mAb 3-8D não interage diretamente com o sítio de ligação à SAG.

Figura 7- Interação da proteína P139-512 recombinante com a SAG usando BIAcore (surface plasmon resonance).



A superfície do chip (CM5) foi recoberta com SAG (~ 1500 RU, unidades de ressonância). Depois, 500 ng da proteína P1₃₉₋₅₁₂ na forma solúvel (linha contínua) ou desnaturada por fervura (pontilhada) foi injetada por 15 segundos. A proteína recombinante na forma solúvel teve uma forte ligação à aglutinina salivar (1 RU ~ 1 picograma/mm²) e foi acompanhada por uma lenta dissociação que é indicativo de aderência à superfície de ressonância. A proteína desnaturada não apresentou adesão à SAG.

4.1.4 Avaliação das propriedades imunogênicas e antigênicas da P1₃₉₋₅₁₂ expressa em *B. subtilis* usando soros policlonais

Para a caracterização da imunogenicidade da proteína P1₃₉₋₅₁₂ camundongos Balb/c foram imunizados por via subcutânea com 5 doses da proteína em conjunto com o adjuvante de Freund. Foram estabelecidos dois grupos de imunização, um grupo com a proteína solúvel e outro com a proteína desnaturada por fervura (P1_{39-512d}). Ambos os soros contra a P1₃₉₋₅₁₂, assim como o soro anti-P1 não apresentaram reação inespecífica com proteínas do *B. subtilis* ou do *S. mutans* (figura 8). Conforme esperado, todos os soros foram reativos com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ presente no extrato total do *B. subtilis* LDV701 induzido e com as proteínas P1 nativa e recombinante, ambas com massa molecular aproximada de 185 kDa (figura 8). O soro anti-P1₃₉₋₅₁₂ reconheceu fracamente a proteína P1 nativa expressa pelo *S. mutans* PC3370C indicando que os epítomos reconhecidos por esse soro podem estar mascarados no contexto da proteína completa. Esse resultado está de acordo com dados anteriores usando os mAbs anti-P1 e demonstra que o uso da proteína P1₃₉₋₅₁₂ como antígeno permite a geração de anticorpos que reconhecem epítomos que são crípticos na proteína nativa, por exemplo, aquele reconhecido pelo mAb 3-8D.

Os anticorpos obtidos com a proteína solúvel ou desnaturada, assim como o anticorpo contra toda a proteína P1 (CG14), foram titulados por meio de ELISA usando as proteínas purificadas P1₃₉₋₅₁₂, P1_{39-512d}, e P1 como antígeno de fase sólida. Como demonstrado no Quadro 4, os maiores títulos de IgG sérico anti-P1₃₉₋₅₁₂ foram obtidos com a proteína solúvel, 7.6×10^4 , enquanto a proteína desnaturada gerou títulos de IgG de 5.8×10^3 .

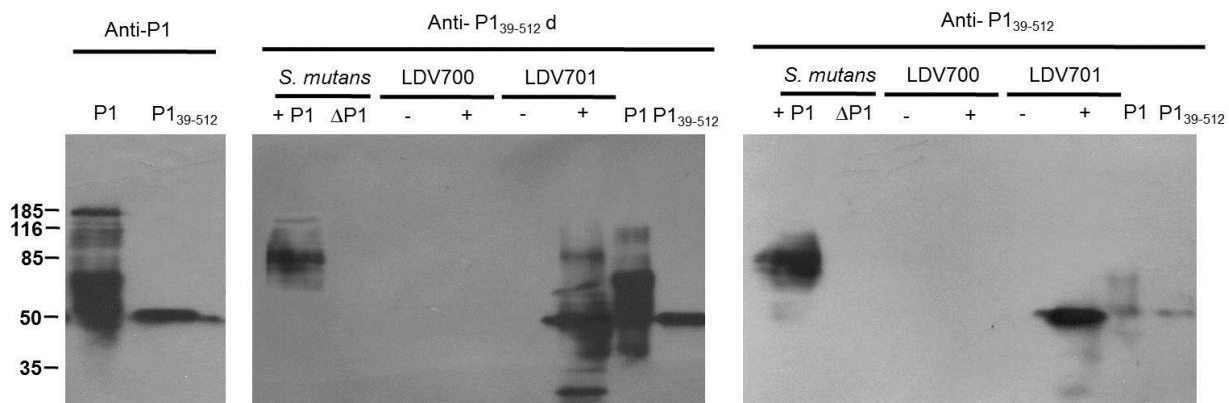
A proteína recombinante solúvel teve reatividade com os soros policlonais anti-P1₃₉₋₅₁₂ e anti-P1_{39-512d} com títulos variando de 7.6×10^4 até 1.1×10^4 , respectivamente. Por outro lado, a reatividade dos soros com a proteína desnaturada P1_{39-512d} foi uma ordem de grandeza inferior quando comparada à proteína na forma solúvel (figura 9A e Quadro 4). Esses resultados sugerem que pelo menos parte dos epítomos antigênicos são afetados pela desnaturação por aquecimento, confirmando os dados obtidos com os mAbs anti-P1.

As propriedades antigênicas da proteína P1₃₉₋₅₁₂ também foram estudadas em ensaios de ELISA empregando três anticorpos policlonais: o primeiro contra o *S. mutans* (α -Smu), o segundo contra a proteína P1 recombinante completa e, por fim, um controle negativo, com anticorpo contra uma linhagem de *S. mutans* nocaute para a proteína P1 (PC3370). Os resultados mostraram que os soros contra a proteína recombinante P1 e contra o *S. mutans* (PC3370C), mas não aquele gerado com a linhagem nocaute, foram fortemente reativos frente à forma nativa e à desnaturada da proteína P1₃₉₋₅₁₂. Como já observado anteriormente, títulos menores de IgG foram obtidos com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ desnaturada (Quadro 4).

Demonstramos ainda que os anticorpos gerados com as formas solúvel e desnaturada da proteína P1₃₉₋₅₁₂ são capazes de reconhecer especificamente a proteína P1 nativa expressa na superfície da linhagem PC3370C de *S. mutans*, mas não na linhagem nocaute PC3370 (figura 9B). Além disso, esse reconhecimento foi semelhante ao observado com o soro anti-P1 (dados não mostrados). Coletivamente, os resultados indicam que os anticorpos produzidos com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ produzida em *B. subtilis* reconhecem a proteína P1 de *S. mutans* e que a desnaturação do antígeno reduz suas propriedades imunológicas.

Os dados corroboram os resultados observados com os anticorpos monoclonais, no qual mostramos que a proteína alvo apresenta epítomos lineares e conformacionais, e que sua desnaturação elimina parte de sua antigenicidade. Assim, a proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ produzida em *B. subtilis* apresenta uma estrutura similar àquela encontrada na proteína P1 nativa de *S. mutans* e um enorme potencial como alvo vacinal.

Figura 8- Especificidade antigênica dos anticorpos produzidos em camundongos imunizados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂.



Western blot revelado com os anticorpos produzidos com as proteínas: (A) P1 recombinante completa; (B) P1₃₉₋₅₁₂ desnaturada; (C) P1₃₉₋₅₁₂ solúvel. Amostras: LDV700, *B. subtilis* contendo o plasmídeo pHT08 vazio; LDV701, *B. subtilis* contendo o plasmídeo pLDV701; P1, proteína recombinante produzida em *E. coli*. (-) amostra antes da indução; (+) amostra após indução.

Quadro 4- Reatividade dos anticorpos policlonais com as proteínas recombinantes P1, P1₃₉₋₅₁₂ ou P1_{39-512d}.

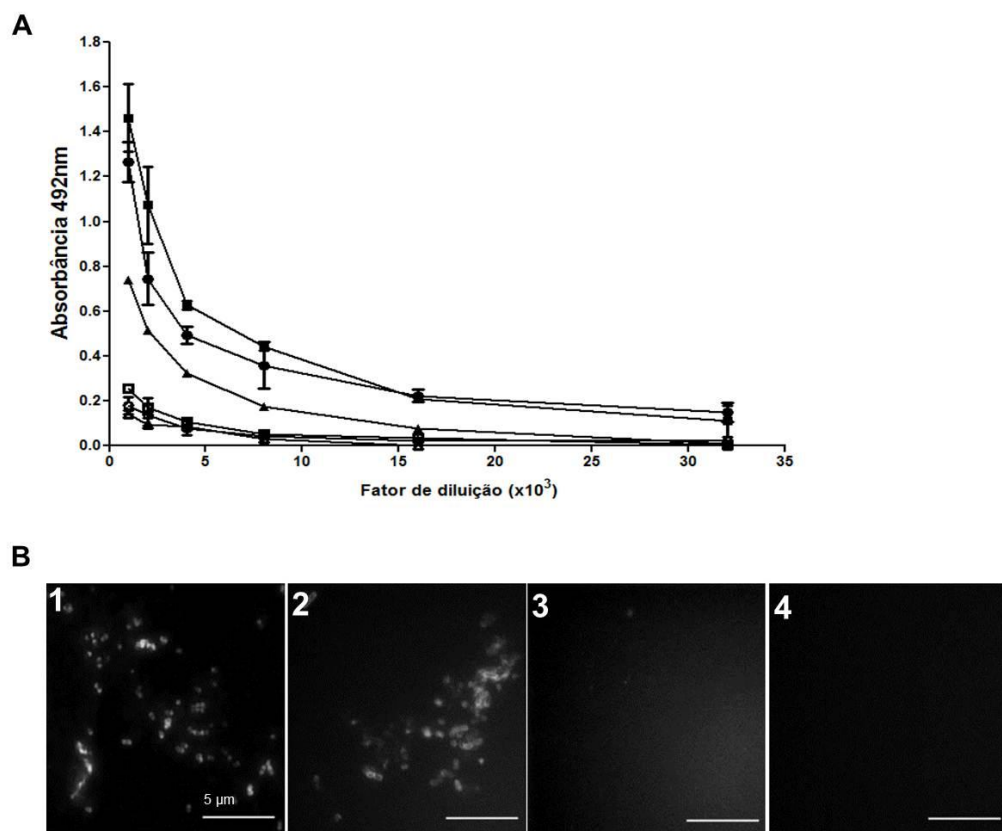
| Anticorpos | Antígeno de fase sólida: | | |
|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | P1 | P1 ₃₉₋₅₁₂ | P1 _{39-512d} |
| Anti-P1 | <u>1.65 x 10⁹</u> | 1.3 x 10 ⁴ | 6.3 x 10 ³ |
| Anti-P1 ₃₉₋₅₁₂ | 7.0 x 10 ³ | <u>7.6 x 10⁴</u> | 6.8 x 10 ³ |
| Anti-P1 _{39-512d} | 8.4 x 10 ³ | 1.1 x 10 ⁴ | <u>5.1 x 10³</u> |
| Anti-Smu ^a | ND | 1.7 x 10 ⁵ | 7.0 x 10 ⁴ |
| Anti-Smu Δ P1 ^b | ND | 2.0 x 10 ² | 1.4 x 10 ² |

a – Anticorpos produzidos em animais imunizados (subcutânea) com o extrato total da linhagem PC3370C de *S. mutans*.

b - Anticorpos produzidos em animais imunizados (subcutânea) com o extrato total da linhagem PC3370 (nocaute para P1) de *S. mutans*.

ND, não determinado;

Figura 9- Reatividade dos soros gerados em camundongos com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ purificada em linhagem recombinante de *B. subtilis* LDV701.



(A) Reatividade dos soros com as proteínas P1₃₉₋₅₁₂ solúvel (não tratada) ou desnaturada por fervura (P1_{39-512d}) (símbolos abertos) e a proteína P1 recombinante completa. Símbolos: (●) anti-P1; (■) anti-P1₃₉₋₅₁₂; e (▲) anti-P1_{39-512d}. (B) Imunofluorescência das linhagens de *S. mutans* marcadas com os soros anti-P1₃₉₋₅₁₂ de camundongos imunizados com os polipeptídeos P1₃₉₋₅₁₂ ou P1_{39-512d} purificados. (1) *S. mutans* PC3370C marcado com o soro anti-P1₃₉₋₅₁₂; (2) *S. mutans* PC3370C marcado com anti-P1_{39-512d}; (3) *S. mutans* PC3370 (ΔP1) marcado com soro anti-P1₃₉₋₅₁₂; (4) *S. mutans* PC3370 (ΔP1) marcado com soro anti-P1_{39-512d}. As células de *S. mutans* foram reveladas com IgG anti-mouse FITC-conjugado.

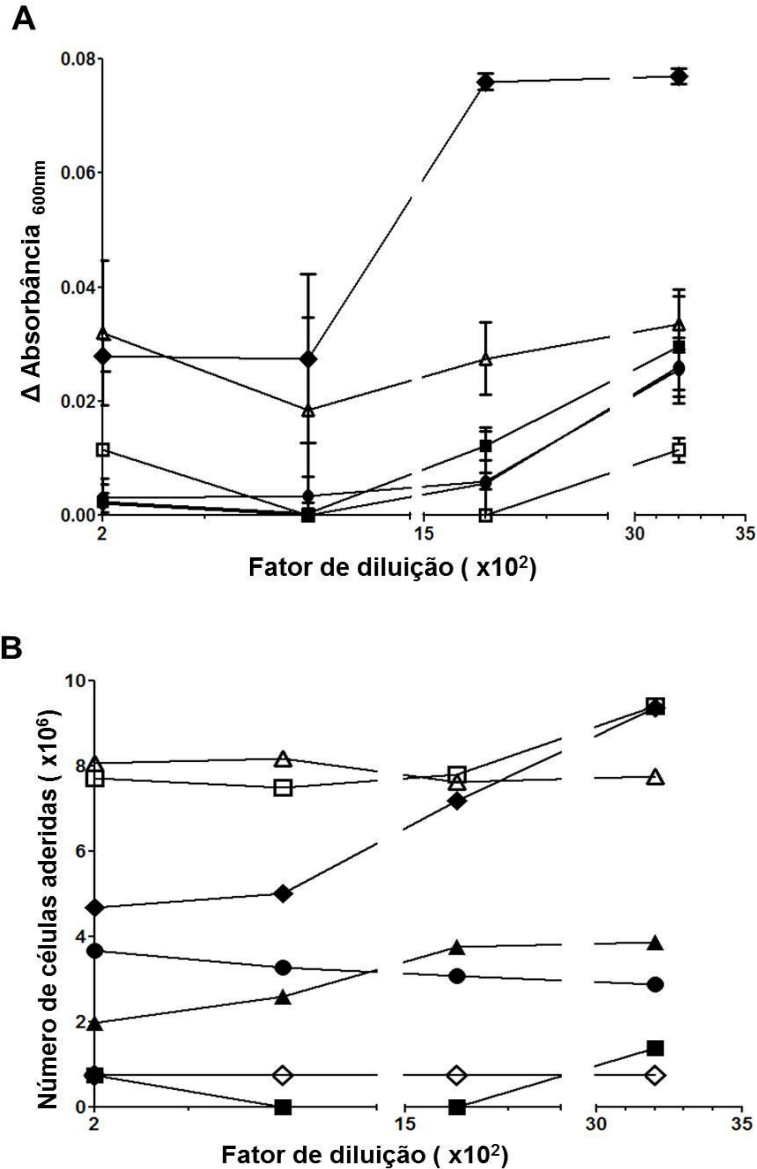
4.1.5 Inibição do processo de agregação e adesão dependente de saliva com anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ e anti-P1_{39-512d}

Para avaliar as características funcionais dos anticorpos gerados contra a proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ produzida em *B. subtilis* analisamos a capacidade desses anticorpos em inibir a agregação e a aderência de *S. mutans* a superfícies abióticas. A interação do *S. mutans* com componentes salivares é um processo multifuncional que determina se a superfície do dente será colonizada ou não. Assim, demonstramos que tanto os anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ quanto o anti-P1_{39-512d} inibem o processo de agregação mediado por saliva de *S. mutans* em níveis similares aos alcançados pelo soro anti-P1 (figura 10A). O soro pré-imune (controle negativo) não teve nenhum efeito nesse processo. Além disso, o efeito anti-agregativo do soro anti-P1 foi, parcialmente, eliminado após adsorção com a proteína P1_{39-512d}, sugerindo que anticorpos contra epítomos termo-sensíveis contidos dentro da proteína alvo podem contribuir para inibição da agregação (figura 10A).

Resultados similares foram obtidos em experimentos que testaram a habilidade destes soros em inibir a adesão do *S. mutans* a microplacas revestidas com saliva. Ambos os anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ e anti-P1_{39-512d} inibiram significativamente a ligação da linhagem PC3370C de *S. mutans* aos constituintes salivares imobilizados (figura 10B). Além disso, a presença de EDTA (3 mM) bloqueou a aderência do *S. mutans* à microplaca como esperado, visto que a interação da P1 com gp340 é cálcio-dependente (CROWLEY et al., 1993). Nenhuma inibição significativa foi observada em presença do soro pré-imune. Não se observou qualquer efeito na agregação e na aderência quando os soros foram testados com a linhagem de *S. mutans* PC3370, nocaute para a proteína P1 (dados não mostrados). Em contraste aos resultados observados com os ensaios de agregação, o soro anti-P1 adsorvido com qualquer das formas da proteína P1₃₉₋₅₁₂ perdeu sua habilidade de inibir a adesão do *S. mutans* PC3370C (figura 10B). Os dados corroboram os resultados anteriores obtidos com os mAbs e indicam a presença de epítomos funcionalmente relevantes na proteína recombinante. Assim, a proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ expressa em *B. subtilis* mostra-se como um antígeno vacinal promissor.

Partes destes resultados foram publicados no periódico FEMS Immunology and Microbiology (Apêndice A).

Figura 10- Determinação da funcionalidade *in vitro* dos anticorpos gerados em camundongos com as proteínas P1₃₉₋₅₁₂ ou P1_{39-512d}.



(A) Inibição da agregação de *S. mutans* mediada por saliva usando anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂. Os valores são expressos como a diferença entre o tempo 0 e o tempo após 1 hora para cada amostra testada (Δ Absorbância_{600nm}). (B) Inibição da aderência de *S. mutans* à saliva imobilizada com soros gerados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂. Controles: soro pré-imune e a presença de 3 mM EDTA. Símbolos: (◆) soro do pré-imune; (●), anti-P1; (■), anti-P1₃₉₋₅₁₂; (▲), anti-P1_{39-512d}; (□) anti-P1 adsorvido com a proteína P1₃₉₋₅₁₂; (△) anti-P1 adsorvido com a proteína P1_{39-512d}; (◇) EDTA (3 mM). Os dados representam a média de três experimentos independentes. Os valores são expressos como média \pm SD. Todos os soros foram diluídos para um título final de 10⁴.

4.2 Capítulo II. Caracterização imunológica de formulações vacinais usando a proteína P1₃₉₋₅₁₂ co-administrada com diferentes adjuvantes

4.2.1 Avaliação da imunogenicidade da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ produzida em *B. subtilis* administrada com diferentes adjuvantes

Conforme demonstrado anteriormente, a proteína P1₃₉₋₅₁₂ produzida em *B. subtilis* preserva propriedades imunogênicas quando associada ao adjuvante de Freund. Entretanto, o uso do adjuvante de Freund não é permitido em humanos. Desta forma, partimos para o estudo imunológico de novas formulações vacinais que utilizam o antígeno P1₃₉₋₅₁₂ associado a três diferentes adjuvantes, um deles licenciado para o uso em humanos (alum ou hidróxido de alumínio (Al(OH)₃)) e dois em fase de estudos experimentais: um variante da LT com baixa toxicidade (LTK4R) (RODRIGUES et al., 2011) e a subunidade formadora do flagelo de *S. Typhimurium* (Flagelina ou FliCi) (BRAGA et al., 2010).

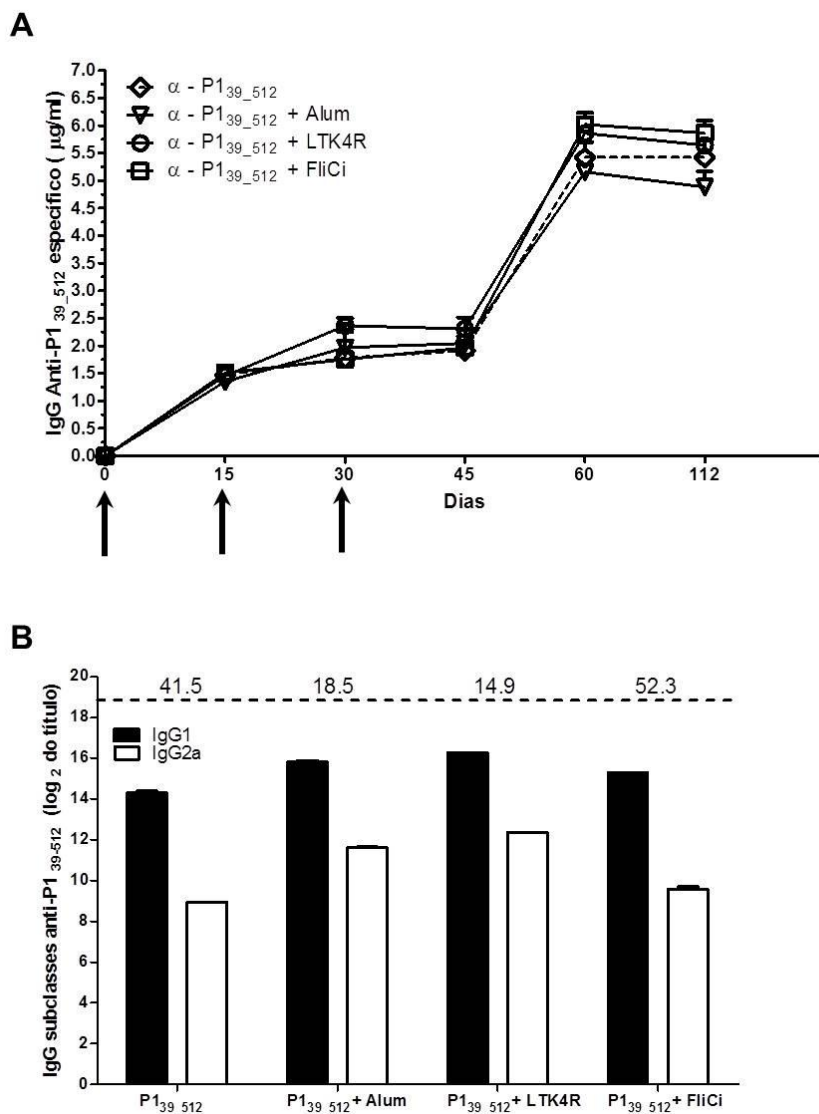
Os soros foram gerados após três doses subcutâneas e as amostras de todas as doses foram testadas tanto para a presença de anticorpos IgG, no soro, quanto de IgA salivar e fecal específicos contra o antígeno P1₃₉₋₅₁₂. Como pode ser observado na figura 11, todas as formulações vacinais empregadas foram capazes de gerar respostas sistêmicas contra a proteína P1₃₉₋₅₁₂. A proteína sem adjuvante foi capaz de induzir níveis de IgG consideráveis após três doses, com concentração aproximada de 1.9 µg/ml, um fato importante visto que trabalhos anteriores descrevem que a SBR recombinante expressa em *E. coli* apresenta uma baixa imunogenicidade (HAJISHENGALLIS; RUSSELL; MICHALEK, 1998).

O uso do alum resultou em um leve aumento dos níveis de IgG específicos após a segunda dose (1.9 µg/ml) e um pouco maior após a terceira dose (2.0 µg/ml). No entanto, na presença da FliCi como adjuvante os níveis de IgG específico foram semelhantes em valores e em comportamento com o grupo imunizado somente com a proteína. O melhor resultado foi obtido quando empregamos duas doses do antígeno associado à variante atóxica LTK4R. Após a terceira dose a concentração de anticorpos mostrou uma leve queda (figura 11). Esses resultados juntos sugerem que

os adjuvantes escolhidos não foram capazes de aumentar a magnitude da resposta imunológica sistêmica e que o antígeno vacinal sozinho apresenta uma boa imunogenicidade. A análise da persistência dos anticorpos séricos anti-P1₃₉₋₅₁₂ mostrou que após a terceira coleta todos os grupos apresentaram um grande aumento nas concentrações de IgG específico que permaneceu por um longo período (figura 11A).

A caracterização das subclasses de IgG demonstrou que todas as formulações vacinais induziram preferencialmente a subclasse IgG1, indicativo de resposta imune do tipo 2. Além disso, houve um aumento nos níveis de IgG2a, nas formulações com Alum e LTK4R quando comparado àquela com a proteína sozinha (figura 11B). Avaliamos ainda a produção de IgA secretado, visto que o *S. mutans* é um patógeno encontrado normalmente na cavidade oral. Nenhuma formulação vacinal testada foi capaz de induzir níveis de IgA específicos detectáveis tanto na saliva quanto nas fezes dos animais (dados não mostrados).

Figura 11- Avaliação da resposta imunológica sistêmica em camundongos imunizados pela via subcutânea com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada aos diferentes adjuvantes.

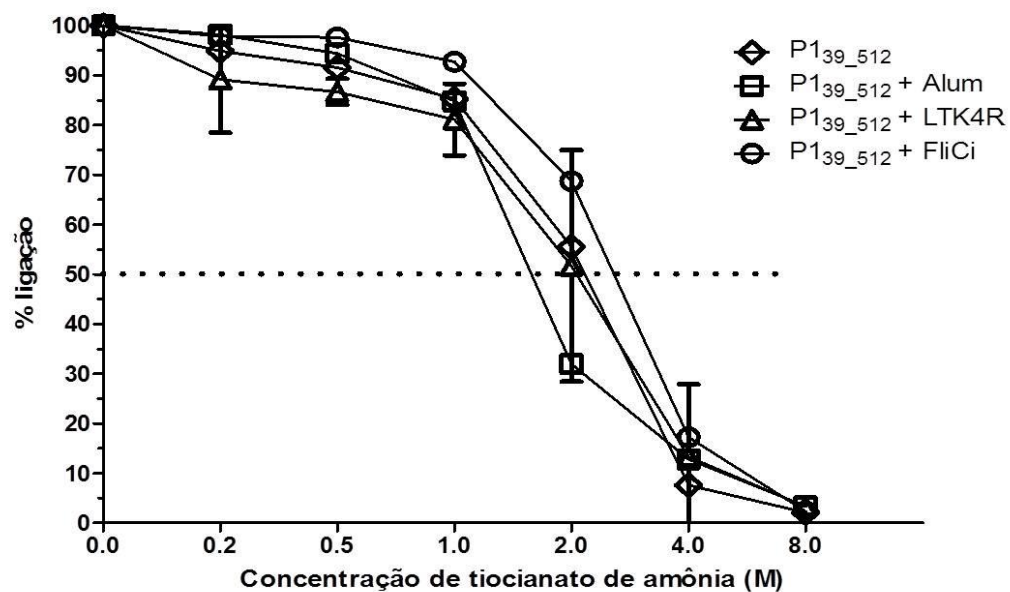


(A) Avaliação dos anticorpos IgG específicos anti-P1₃₉₋₅₁₂. Animais Balb/c fêmeas foram submetidos ao protocolo vacinal de 3 doses subcutâneas (setas inferiores) com 10 µg do antígeno vacinal P1₃₉₋₅₁₂ produzido e purificado a partir da linhagem *B. subtilis* LDV701 sozinho, ou com hidróxido de alumínio (Alum, 12.4 µg) ou LTK4R (1 µg) ou Flagelina (FliCi, 5 µg). As amostras foram coletadas duas semanas após cada dose e após a última dose até o dia 112, e foram avaliadas em pool. (B) Determinação dos títulos das subclasses de IgG anti-P1₃₉₋₅₁₂ específicos. Dados indicados na parte superior do gráfico indicam a razão entre IgG1 e IgG2a dos soros. Os dados representam os resultados de dois ensaios independentes.

4.2.2 Caracterização dos soros gerados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada a adjuvantes quanto à avidéz pelo antígeno

Em seguida, determinamos a avidéz dos anticorpos específicos ao antígeno vacinal, visto que anticorpos com maior avidéz são mais difíceis de romper devido a uma maior interação antígeno-anticorpo. Como pode ser observado na figura 12A, a concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar 50% dos anticorpos ligados à proteína P1₃₉₋₅₁₂ em todos as formulações vacinais foram semelhantes, aproximadamente 2 M de tiocianato de amônio. O soro com maior avidéz apresentou um valor aproximado de 2.3 M e o menor de 1.6 M, representado respectivamente pelos soros produzidos com a FliCi e com o Alum (figura 12A). Nossos resultados sugerem que a presença dos adjuvantes não alterou de forma significativa a avidéz dos anticorpos gerados.

Figura 12- Determinação da avidéz dos anticorpos em relação ao antígeno vacinal P1₃₉₋₅₁₂.



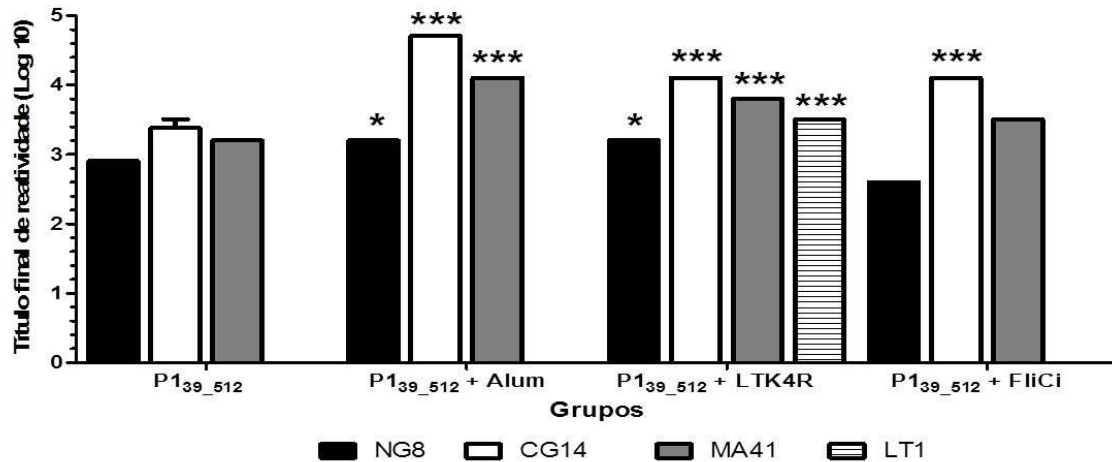
A proteína P1₃₉₋₅₁₂ foi usada como antígeno de fase sólida e os soros usados foram normalizados para uma absorbância de 1. Os soros (3^a dose) foram normalizados para a realização do ensaio.

4.2.3 Avaliação da antigenicidade dos fragmentos de P1 usando os soros gerados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada aos adjuvantes

Em seguida, perguntamos se o uso dos adjuvantes alteraria a reatividade dos anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂ (região pré A, região A ou região V) frente à proteína P1 inteira nativa ou fragmentos recombinantes (figura 2). Todos os soros foram capazes de reconhecer a proteína P1 nativa na superfície do *S. mutans* NG8. Os soros produzidos com os adjuvantes LTK4R e Alum apresentaram os melhores resultados com uma elevada reatividade frente à proteína nativa (títulos finais de 1.6×10^3) (Figura 13B). Além disso, não houve uma alteração na reatividade entre o grupo imunizado com a proteína sozinha ou com o adjuvante FliCi. Todos os soros reconheceram a proteína CG14 (proteína P1 completa produzida em *E. coli*), entretanto a diferença entre as amostras foi mais evidente. Os títulos finais de reconhecimento variaram de 2.4×10^3 (P1₃₉₋₅₁₂) até 5.1×10^4 (Alum) (figura 13B).

Como esperado todos os soros tiveram alta reatividade com a proteína MA41, que codifica a região A da proteína P1 de *S. mutans*. Os maiores títulos foram observados quando os adjuvantes foram associados ao antígeno (figura 13B). Apenas o soro produzido com a LTK4R, como adjuvante, gerou anticorpos específicos para a região V, como demonstrado pela reatividade contra o fragmento LT1 (figura 13B). A análise feita com a região pré A (fragmento NR5 produzido em *E. coli*) foi inconclusiva, possivelmente devido ao pequeno tamanho da proteína e o arranjo incorreto desta (dados não mostrados). Todos os dados indicam que os soros gerados foram capazes de reconhecer tanto a proteína completa nativa quanto à proteína recombinante, e que os anticorpos estão preferencialmente direcionados para epítomos localizados na região A. Os resultados sugerem, ainda, que o uso dos adjuvantes aumentou significativamente a reatividade aos domínios da proteína P1. Por fim, a LTK4R foi o único adjuvante que modulou a resposta induzindo anticorpos contra epítomos presentes na porção V (49 resíduos de aminoácidos) da proteína P1₃₉₋₅₁₂.

Figura 13- Reatividade dos soros com a proteína P1 nativa de *S. mutans* NG8 e os fragmentos truncados da P1.

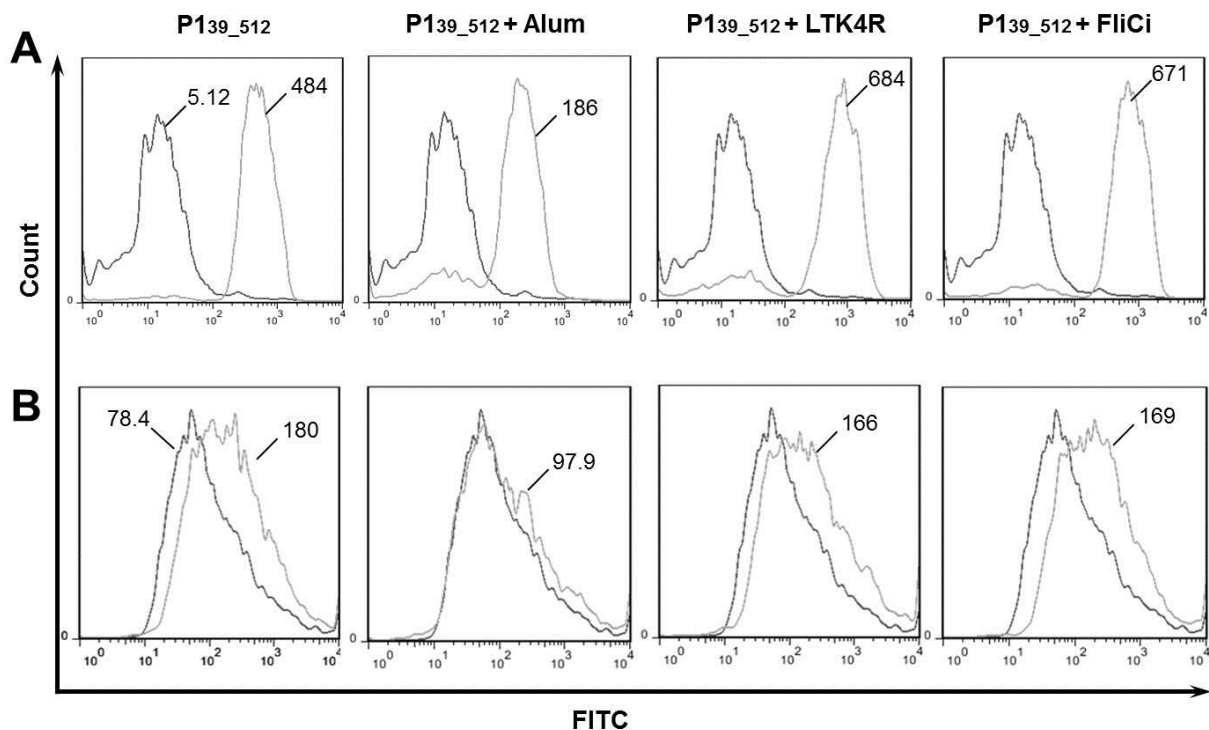


As proteínas purificadas e a bactéria inteira NG8 foram empregadas como antígeno de fase sólida em ensaio de ELISA usando os soros das imunizações (3ª dose). Os antígenos usados: NG8 - *S. mutans* inteiro; CG14- proteína P1 recombinante completa; MA41- fragmento correspondente apenas à região A; LT1 - fragmento correspondente à região V. Os valores estatísticos são em relação ao valor do soro gerado apenas com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ sozinha. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001.

4.2.4 Ativação da via clássica do complemento pelos soros policlonais gerados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada aos diferentes adjuvantes

A deposição do complemento na superfície do *S. mutans* mediada por anticorpos policlonais gerados contra a proteína P1₃₉₋₅₁₂ foi avaliada por meio de citometria de fluxo. Inicialmente avaliamos a capacidade de cada soro em se ligar à proteína P1 nativa na superfície do *S. mutans* UA159. Todos os soros interagiram de maneira semelhante com a bactéria, com exceção do soro gerado com alum que apresentou a menor reatividade entre as amostras testadas (figura 14A). O soro controle anti-PBS não é reativo com a superfície bacteriana (controle negativo). Quanto à capacidade de depositar a proteína C3 do complemento podemos observar que os soros gerados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ sozinha ou com os adjuvantes LTK4R ou FliCi foram positivos. Por outro lado, o soro gerado com Alum não mostrou um efeito significativo (figura 14B). Os dados indicam que o antígeno vacinal P1₃₉₋₅₁₂, mesmo na ausência de adjuvantes, é capaz de induzir anticorpos ativadores da via clássica do complemento. Além disto, o Alum foi o único adjuvante a modular a resposta reduzindo a deposição da proteína C3 do complemento. A deposição de proteínas do complemento pela via clássica é um importante mecanismo de eliminação de patógenos.

Figura 14- Deposição do complemento na superfície de *S. mutans* na presença de anticorpos anti-P1₃₉₋₅₁₂.



(A) Capacidade de ligação dos soros à proteína P1 nativa na superfície da bactéria *S. mutans* UA159. (B) Deposição da proteína C3 do complemento usando os soros contra a proteína P1₃₉₋₅₁₂. Os soros usados estão indicados na parte superior do gráfico. Amostras: cinza escuro – *S. mutans* incubado com soro anti-PBS (controle negativo); cinza claro – *S. mutans* incubado com os anticorpos produzidos com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ sozinha ou associada aos adjuvantes. Dados mostrados na figura representam os valores da mediana.

4.2.5 Funcionalidade *in vitro* dos soros gerados com a proteína P1₃₉₋₅₁₂ associada a adjuvantes em bloquear a adesão do *S. mutans* NG8 à SAG

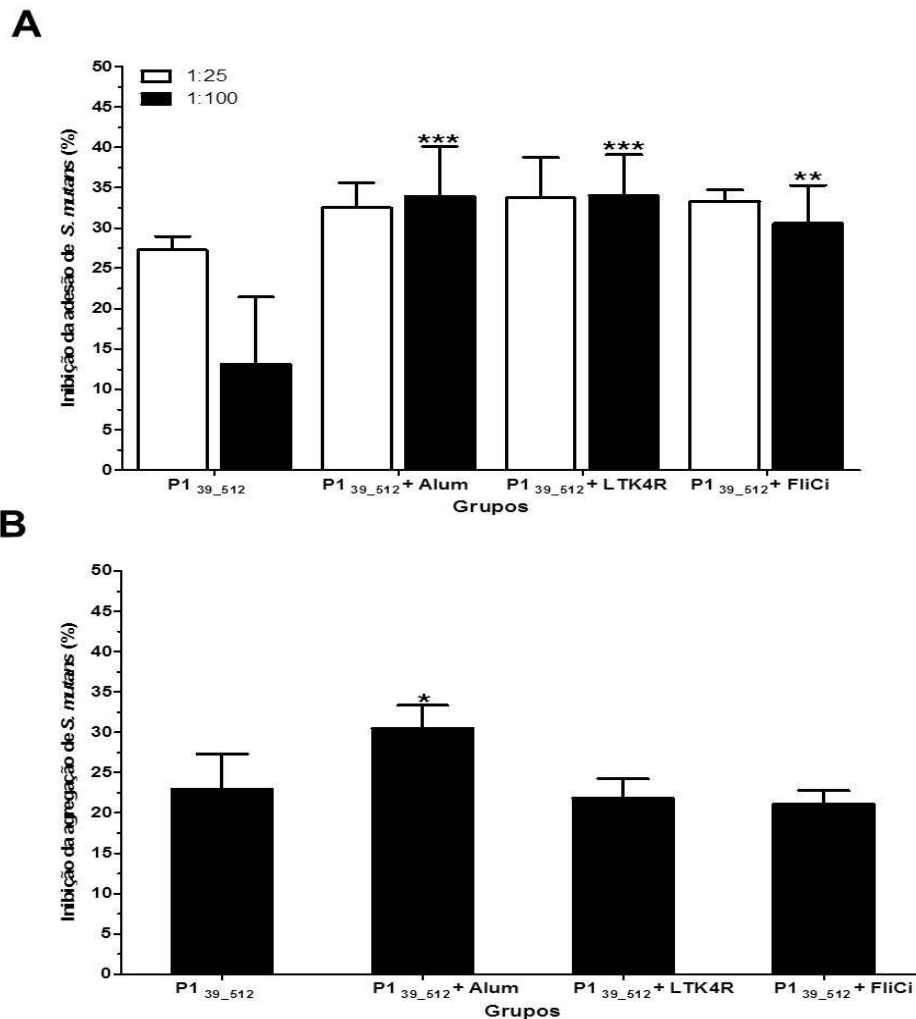
Prosseguimos no estudo funcional de cada soro avaliando o potencial de bloqueio da adesão do *S. mutans* à SAG imobilizada empregando o sistema de BIAcore. Avaliamos para cada amostra (3ª dose) duas diluições diferentes (1:25 e 1:100). Na diluição 1:25, os soros mostraram inibição da adesão de *S. mutans* variando entre 31.9% (P1₃₉₋₅₁₂) até 36.3% (P1₃₉₋₅₁₂ + LTK4R) (figura 15A). Entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o soro produzido com a P1₃₉₋₅₁₂ e a proteína associada com qualquer dos adjuvantes usados. Por outro lado, na diluição 1:100 observamos uma grande inibição da adesão para os grupos imunizados com a proteína alvo e os adjuvantes Alum (33.95%), LTK4R (34.0%) e FliCi (33.9%), e a amostra produzida apenas com proteína teve níveis baixos de inibição, por volta de 13% (figura 15A). Os dados sugerem que a associação dos adjuvantes com a proteína recombinante foi importante para modulação funcional da resposta imunológica, aumentando primordialmente a qualidade dos soros com a indução de anticorpos com maior capacidade de bloquear a adesão do *S. mutans* à SAG imobilizada.

4.2.6 Inibição da agregação de *S. mutans* NG8 *in vitro* usando os soros policlonais gerados com os diferentes adjuvantes

Uma formulação vacinal contra o *S. mutans* deve bloquear eficientemente a adesão da bactéria e ter um efeito mínimo sobre a agregação, pois essa última representa um mecanismo não imune de proteção do hospedeiro. Assim, verificamos a capacidade diferencial de cada soro produzido (3ª dose) em bloquear o processo de agregação. Usando a diluição de 1:100, observamos bloqueios da agregação que variaram de 21% (P1₃₉₋₅₁₂+ FliCi) até um máximo de 30.5% (P1₃₉₋₅₁₂+ Alum) (figura 15B). Os soros produzidos com os adjuvantes LTK4R e FliCi tiveram níveis de bloqueio da agregação semelhantes aos do grupo imunizado apenas com a proteína, aproximadamente 22%. Os dados indicam que os adjuvantes, principalmente a

LTK4R e FliCi, aumentaram o potencial de proteção dos anticorpos contra o *S. mutans*.

Figura 15- Funcionalidade dos soros gerados após imunização da proteína P1₃₉₋₅₁₂ co-administrada com diferentes adjuvantes.



(A) Inibição da adesão de *S. mutans* NG8 à SAG imobilizada empregando soros anti- P1₃₉₋₅₁₂ em sistema BIAcore. A bactéria foi incubada com diferentes concentrações de anticorpos (1:25; 1:100). A variação na unidade de ressonância (Δ RU) foi determinada e empregada para calcular a porcentagem de inibição da adesão. (B) Inibição da agregação *in vitro* de *S. mutans* NG8 à SAG livre com os soros gerados. A bactéria preparada foi incubada com diferentes concentrações de anticorpos (1:100). A diferença entre T0 e T1 (Δ T) foi usada para calcular a taxa de inibição da agregação de *S. mutans*. Os soros de animais imunizados com PBS foram usados como controle e subtraídos dos valores finais de inibição. Os valores finais representam resultados de três ensaios independentes realizados em duplicata.

4.2.7 Discussão do Capítulo I e II

Na presente etapa do trabalho avaliamos duas características importantes para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra a cárie dental: as propriedades do antígeno vacinal alvo e a modulação imunológica promovida por adjuvantes. Diferentes antígenos alvos já foram usados para estudo de vacinas contra a cárie dental humana, contudo a baixa imunogenicidade, conformação inadequada e instabilidade são comumente descritos (BRADY et al., 2010; SHIVAKUMAR; VIDYA; GHANDU, 2009). Além disso, muitas vezes a caracterização do antígeno é limitada. Nosso trabalho é baseado em um fragmento derivado da proteína P1 de *S. mutans*, denominado de P1₃₉₋₅₁₂. Esse antígeno compreende três grandes domínios funcionais da P1: a região pré-A, a região SBR ou A e um pequeno fragmento da região V (49 aminoácidos), e foi produzido em sistema de expressão de *B. subtilis*. Os resultados apresentados aqui aprofundam nosso conhecimento sobre a qualidade da proteína recombinante produzida em *B. subtilis* e os dados obtidos com os mAbs anti-P1 corroboram os resultados anteriormente apresentados usando soros policlonais (TAVARES et al., 2010). A proteína P1₃₉₋₅₁₂ apresenta epítomos lineares e conformacionais reconhecidos pelos principais mAbs anti-P1, além disso apresenta comportamento semelhante à proteína P1 nativa expressa na superfície da bactéria ou P1 recombinante, e até mesmo com fragmentos expressos por linhagens de *E. coli*. Um ponto importante do trabalho foi a constatação de que a proteína P1₃₉₋₅₁₂ apresenta um sítio de ligação à SAG humana e, sobretudo, a demonstração de que esse domínio tem características conformacional termo-lábeis. A coadministração da proteína com os adjuvantes foi importante para a modulação qualitativa da resposta imune sistêmica, com maior taxa de reconhecimento da proteína P1 na superfície da bactéria ou da proteína P1 recombinante. Os anticorpos gerados com os adjuvantes, principalmente a LTK4R e a flagelina (FliCi), foram mais eficientes para o bloqueio da adesão de *S. mutans* à SAG e tiveram um baixo efeito anti-agregativo. Em resumo, o fragmento da P1 produzido em sistema de *B. subtilis* apresenta um enorme potencial como alvo em estratégias vacinais de subunidade contra o *S. mutans* empregando adjuvantes.

Com a finalidade de aprofundar o conhecimento sobre a estrutura e o potencial da proteína P1₃₉₋₅₁₂ produzida em *B. subtilis* como alvo vacinal, nós avaliamos a presença e a preservação de epítomos contínuos e descontínuos usando anticorpos monoclonais anti-P1. Um painel de 11 monoclonais anti-P1 foi extensivamente explorado para caracterizar a estrutura e função da proteína P1 (AYAKAWA et al., 1987; BRADY et al., 1991). Os mAbs variam quanto à suas capacidades de inibir a adesão ou à agregação e na modulação em imunocomplexos (BRADY et al., 1991; 1992; McARTHUR et al., 2007; OLI; McARTHUR; BRADY, 2004; ROBINETTE et al., 2011). Recentemente com a resolução de estrutura terciária da proteína P1 foi possível estabelecer suas localizações na proteína tridimensional (BRADY et al., 2010; LARSON et al., 2010, 2011). Os mAbs 3-8D, 1-6F, 4-9D e 4-10A reconhecem epítomos das regiões contidas no antígeno vacinal P1₃₉₋₅₁₂. Esses mAbs reconhecem regiões que inibem a adesão do *S. mutans*, e com exceção do mAb 4-10A que é reativo com epítomos descontínuos, todos os outros ainda não foram claramente descritos quanto à especificidade de reconhecimento de epítomos (BRADY et al., 1991; HAJISHENGALLIS; RUSSELL; MICHALEK, 1998; McARTHUR et al., 2007; OLI et al., 2004; SENPUKU et al., 2001; TAKAHASHI et al., 1991). A proteína P1₃₉₋₅₁₂ foi reconhecida pelos quatro mAbs usados, entretanto os com maior reatividade foram os mAbs 1-6F e 3-8D, indicando a preservação desses epítomos. Adicionalmente, demonstramos que os epítomos reconhecidos pelos mAb 1-6F, 4-9D e 4-10A são conformacionais e termo-lábeis, e aquele reconhecido pelo mAb 3-8D é linear, na proteína alvo. Na proteína P1 expressa na superfície da bactéria assim como nas proteínas recombinantes o mesmo comportamento foi observado para os epítomos reconhecidos pelos mAbs 1-6F e 3-8D. Os dados sugerem a presença tanto de epítomos lineares quanto descontínuos na proteína P1₃₉₋₅₁₂ recombinante, os quais apresentam um comportamento semelhante aos presentes na proteína P1 nativa. Além disso, confirmamos que o epítomo reconhecido pelo mAb 3-8D, localizado na região SBR, é parcialmente mascarado quando na proteína P1 completa. A conservação de epítomos importantes na P1₃₉₋₅₁₂ indica seu potencial como alvo na geração de anticorpos protetores contra o *S. mutans* em estratégias vacinais anti-cárie.

A adesão do *S. mutans* ao dente é dependente de um processo multivalente e complexo entre o seu principal antígeno de superfície, a proteína P1, e a glicoproteína 340 (gp340), ou SAG, presente na película adquirida adsorvida ao dente (HAJISHENGALLIS; KOGA; RUSSELL, 1994; LIGTENBERG et al., 2007; LOIMARANTA et al., 2005; OHO et al., 1998; PRAKOBPHOL et al., 2000). Até o momento, foram identificados dois sítios de ligação à SAG dentro da proteína P1 (KELLY et al., 1998; LARSON et al., 2010, 2011; MUNRO et al., 1993). Os sítios estão localizados tanto na porção N-terminal quanto C-terminal e não competem entre si pela SAG indicando que são sítios distintos de ligação (LARSON et al., 2011). O sítio de ligação à SAG na porção amino-terminal está localizado entre a terceira região de repetição de alanina, a região V e a primeira região de repetição de prolina (fragmento denominado A₃VP₁) (LARSON et al., 2010, 2011). Em nosso trabalho, nós demonstramos que a proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ apresenta o sítio de ligação à SAG imobilizada, sugerindo que possivelmente o sítio identificado na porção N-terminal da proteína P1 deve estar localizado entre a porção final da região A e o início da porção V, já que a proteína recombinante usada não apresenta nenhum fragmento da região P. Além disso, o sítio de ligação à SAG é complexo e sensível à desnaturação térmica. Oho et al. (1998) demonstraram que o sítio de interação na SAG com a proteína P1 recombinante é também complexo e termolábil. Os dados completam as informações apresentadas por outros grupos e permitem aprofundar o conhecimento do antígeno P1₃₉₋₅₁₂ produzido em *B. subtilis* como alvo vacinal e elucidar melhor a interação entre o antígeno P1 e seu receptor na superfície dental.

Adjuvantes são substâncias que aumentam a potência, qualidade ou a longevidade da resposta imunológica ao antígeno alvo causando a menor toxicidade possível. Atualmente, o papel imprescindível do adjuvante é reconhecido principalmente em vacinas de subunidades onde peptídeos ou proteínas recombinantes purificadas são pouco imunogênicas e/ou induzem respostas imunes inadequadas (ALVING et al., 2012; FOGED, 2011; OYSTON; ROBSON, 2012). Em trabalho prévio nós demonstramos as propriedades antigênicas e imunogênicas do fragmento P1₃₉₋₅₁₂ produzido em *B. subtilis* co-administrado com o adjuvante de Freund pela via subcutânea, e o potencial desta estratégia para o controle do *S.*

mutans (TAVARES et al., 2010). Entretanto, o uso do adjuvante de Freund em humanos pode apresentar inúmeros efeitos colaterais (GUPTA; SIBER, 1995). Assim, neste estudo avaliamos uma formulação vacinal baseada na proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ co-administrada com diferentes adjuvantes, na tentativa de desenvolver estratégias mais eficazes para o controle da cárie dental humana causada pelo *S. mutans*. Diversos adjuvantes estão disponíveis e apresentam potencial para futuro uso em humanos (ALVING et al., 2012). Usamos neste trabalho o hidróxido de alumínio ou alum, com amplo uso em humanos e com direcionamento para uma resposta humoral; uma variante atóxica da LT de *E. coli* enterotoxigênica, a LTK4R; e a subunidade estrutural do flagelo de *S. Thypimurium*, a FliCi recombinante (BRAGA et al., 2008; MBOW; DE GREGORIO; ULMER, 2011; RODRIGUES et al., 2011). A imunização parental da proteína P1₃₉₋₅₁₂ recombinante em associação com cada um dos três adjuvantes estudados não foi capaz de ampliar a magnitude da resposta de anticorpos específicos sistêmicos, nem foram capazes de induzir respostas de mucosa quando comparado com o grupo imunizado com a proteína apenas. Além disso, a persistência da resposta imune sistêmica por mais de 100 dias não foi influenciada por qualquer dos adjuvantes usados. A ausência do efeito adjuvante destas proteínas nas formulações podem refletir fatores como a via de administração usada, número de doses, e a concentração dos adjuvantes usados, ou até mesmo, a somatória de todos esses fatores.

A qualidade da resposta imune após a coadministração da proteína recombinante com os adjuvantes foi avaliada por meio de ensaio de avides, de deposição do complemento e reatividade com a proteína P1 e seus fragmentos. A análise de dissociação ou desnaturação é baseada na premissa que as interações antígeno-anticorpo mediadas por anticorpos de maior avides são mais difíceis de romper que aquelas mediadas por anticorpos com baixa avides. De fato, o uso dos adjuvantes não foi suficiente para alterar significativamente a avides dos anticorpos pelo antígeno P1₃₉₋₅₁₂, sugerindo que esses podem não apresentar papel funcional diferentes no controle do processo patogênico. Isto porque a avides representa a força de ligação entre antígenos e anticorpos multivalentes, refletindo com maior precisão o papel biológico dos anticorpos. Inúmeros mecanismos de defesa do

hospedeiro mediados por anticorpos como, por exemplo, a ativação do complemento, neutralização e opsonização são afetados pela avidéz dos anticorpos participantes (ALPERS; STEWARD; SOOTHILL, 1972; SIX; UEMURA; KINSKY, 1973). Para confirmar essa questão avaliamos a capacidade dos soros em depositar a proteína C3 do complemento, e curiosamente apenas o soro produzido com o hidróxido de alumínio não foi capaz de depositar o complemento, assim como teve a menor taxa de ligação à proteína nativa na superfície do *S. mutans*. O conjunto de dados indica que a pequena diferença na avidéz observada entre a amostra produzida com alum e os outros grupos vacinais foi suficiente para diferenciá-los quanto ao seu papel biológico na ativação do complemento. De particular interesse foi o fato que a coadministração com os adjuvantes, principalmente com a LTK4R, aumentou significativamente o reconhecimento da proteína P1 nativa na superfície do patógeno e induziu anticorpos com maior reatividade com os diferentes fragmentos da P1. Animais imunizados com a LTK4R e o antígeno alvo produziram anticorpos capazes de reconhecer um fragmento não reativo com anticorpos obtidos nos animais submetidos às outras formulações vacinais. Os dados sugerem que, nessas estratégias vacinais, o uso dos adjuvantes foi importante para melhorar a qualidade dos anticorpos gerados embora não tenham alterado quantitativamente os títulos de anticorpos gerados.

A proteína P1 e seus domínios funcionais são os principais candidatos vacinais no controle do *S. mutans* sendo alvos de anticorpos protetores tanto em imunizações ativas quanto passivas. Por meio da complexa interação entre a proteína P1 e a SAG livre ou adsorvida à superfície do dente o destino do *S. mutans* na cavidade oral será traçado, com agregação e deglutição ou adesão e persistência, respectivamente. O processo de adesão beneficiará o patógeno enquanto a agregação trará vantagens para o hospedeiro. Assim, em uma estratégia vacinal anti-cárie o papel funcional dos anticorpos deve valorizar a indução de anticorpos inibidores da adesão e reduzir o impacto na aglutinação bacteriana. A administração da proteína P1₃₉₋₅₁₂ em conjunto com qualquer um dos três adjuvantes resultou em anticorpos fortemente inibidores da adesão do *S. mutans* à SAG imobilizada, com taxas significativamente superiores aos anticorpos produzidos com a proteína recombinante apenas. Quanto à

agregação, os anticorpos produzidos com os adjuvantes LTK4R ou FliCi mantiveram níveis semelhantes de interferência quando comparados ao soro produzido apenas com a proteína. Curiosamente, animais imunizados com a proteína recombinante e o alum tiveram um aumento na inibição da agregação do *S. mutans*. Os resultados indicam mais uma vez que o uso dos adjuvantes LTK4R ou FliCi nas formulações vacinais foram responsáveis por uma modulação qualitativa da resposta imune sistêmica contra o antígeno de superfície de *S. mutans*, a proteína P1.

O *B. subtilis* apresenta uma enorme capacidade para produzir proteínas heterólogas com aplicação biotecnológica (PHAN; NGUYEN; SCHUMANN, 2012; POHL; HARWOOD, 2010; SCHUMANN, 2007). Entretanto, ao contrário de outros modelos o seu potencial para a geração de antígeno vacinal, assim como as propriedades antigênicas e imunogênicas das proteínas recombinantes produzidas por este sistema tem sido pouco explorado (BAEK et al., 2012; IDÄNPÄÄN-HEIKKILÄ et al., 1996; TAVARES et al., 2010). Nossos resultados demonstraram claramente que a proteína P1₃₉₋₅₁₂ produzida e purificada a partir de uma linhagem recombinante de *B. subtilis* tem características favoráveis para seu uso como antígeno alvo em formulações vacinais acelulares contra o *S. mutans*. Além disto, a coadministração do antígeno e dos adjuvantes LTK4R ou FliCi foram importantes para a modulação qualitativa da resposta efetora contra o patógeno oral. Coletivamente os resultados demonstram uma nova e promissora alternativa para o desenvolvimento de vacinas de subunidade contra a cárie dental humana.

4.3 Capítulo III. Desenvolvimento e caracterização dos esporos adesivos de *B. subtilis* como veículo vacinal de entrega de mucosa

Vetores bacterianos para entrega de antígeno ao sistema imune de mucosa representam uma ferramenta importante no desenvolvimento de vacinas. Os sistemas usualmente utilizados são baseados em bactérias patogênicas atenuadas, como a *Salmonella* e a *Listeria*, porém o risco de reversão ao fenótipo virulento reduz drasticamente o interesse nesses veículos. Uma alternativa aos sistemas convencionais é o uso de bactérias não-patogênicas, como é o caso do *B. subtilis*. O emprego do *B. subtilis* como veículo vacinal vivo tem diversas vantagens, entre elas o custo e o fato de ser uma espécie não invasiva e com amplo potencial de uso.

O *B. subtilis* é utilizado como veículo vacinal de mucosa em duas formas: esporos, com a expressão do antígeno vacinal em sua superfície, e células vegetativas, com a expressão intracelular do antígeno vacinal *in vivo* após germinação (ISTICATO et al., 2001; PACCEZ et al., 2006, 2007). Os resultados obtidos até o momento indicam que tanto esporos como células de *B. subtilis* apresentam baixa imunogenicidade após administração oral (FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005). Tal característica poderia estar associada ao rápido trânsito dos esporos pelo intestino reduzindo sua captura pelas células imunológicas presentes no tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (TGI). Desta forma, nosso objetivo nesta etapa foi avaliar se a inclusão de adesinas bacterianas na superfície do esporo de *B. subtilis* poderia aumentar a imunogenicidade do antígeno vacinal ao aumentar seu tempo de permanência no TGI de animais e direcionar de forma mais eficiente o antígeno para as células do sistema imune de mucosa.

Desta forma, foram construídas três linhagens de esporos de *B. subtilis* geneticamente modificados capazes de expressar adesinas bacterianas em sua superfície. A estratégia utilizada consistiu na clonagem da porção N-terminal da proteína CotB (presente na capa do esporo) fusionada à região ligadora da proteína da camada S (SlpA) de *L. brevis* ou à região ligadora da proteína Invasina (denominada de Inv600) de *Y. pseudotuberculosis* ou a InvA completa. Além disso, construímos um vetor que permite a expressão intracelular da proteína P1₃₉₋₅₁₂

quando essas linhagens estivessem em estágio de célula vegetativa e sob o comando do promotor induzível por estresse (temperatura, variações de oxigênio e outros). Nossos resultados demonstraram a capacidade das linhagens recombinantes em expressar as proteínas recombinantes nos compartimentos e estágios celulares de interesse. Demonstramos, ainda, que a funcionalidade das adesinas bacterianas *in vitro* e *in vivo* estavam preservadas e permitiram um aumento da persistência no TGI dos animais e direcionamento para as placas de Peyer, assim como aumento do número de células vegetativas e esporos recuperados nos animais imunizados oralmente com os esporos adesivos de *B. subtilis*. A imunogenicidade sistêmica e de mucosa do antígeno vacinal P1₃₉₋₅₁₂ carregado, após administração oral dos esporos adesivos, foi aumentada significativamente e houve a geração de anticorpos efetores capazes de bloquear a adesão *in vitro* do *S. mutans* ao SAG. Além disso, avaliamos se o uso de outras rotas de imunização mucosa como a nasal e sublingual poderiam gerar resultados superiores aos encontrados com a imunização oral. Usando essas novas vias de administração houve um aumento significativo na resposta imune sistêmica contra o antígeno. Os anticorpos produzidos com estes protocolos vacinais foram ainda mais efetores, com elevada capacidade de bloquear a adesão do *S. mutans* ao SAG. A imunização nasal e sublingual permitiu, ainda, uma redução drástica no número de doses (três em vez de nove) e na quantidade de esporos administrados por dose (10^8 esporos/dose em vez de 5×10^{10} esporos/dose) sem comprometimento da resposta sistêmica. Vale ressaltar que esse trabalho foi o primeiro a associar com sucesso as duas abordagens mais promissoras usando o *B. subtilis* como veículo de entrega, e permitir um direcionamento dos esporos para o tecido linfóide associado à mucosa, com consequente aumento da imunogenicidade do antígeno carregado.

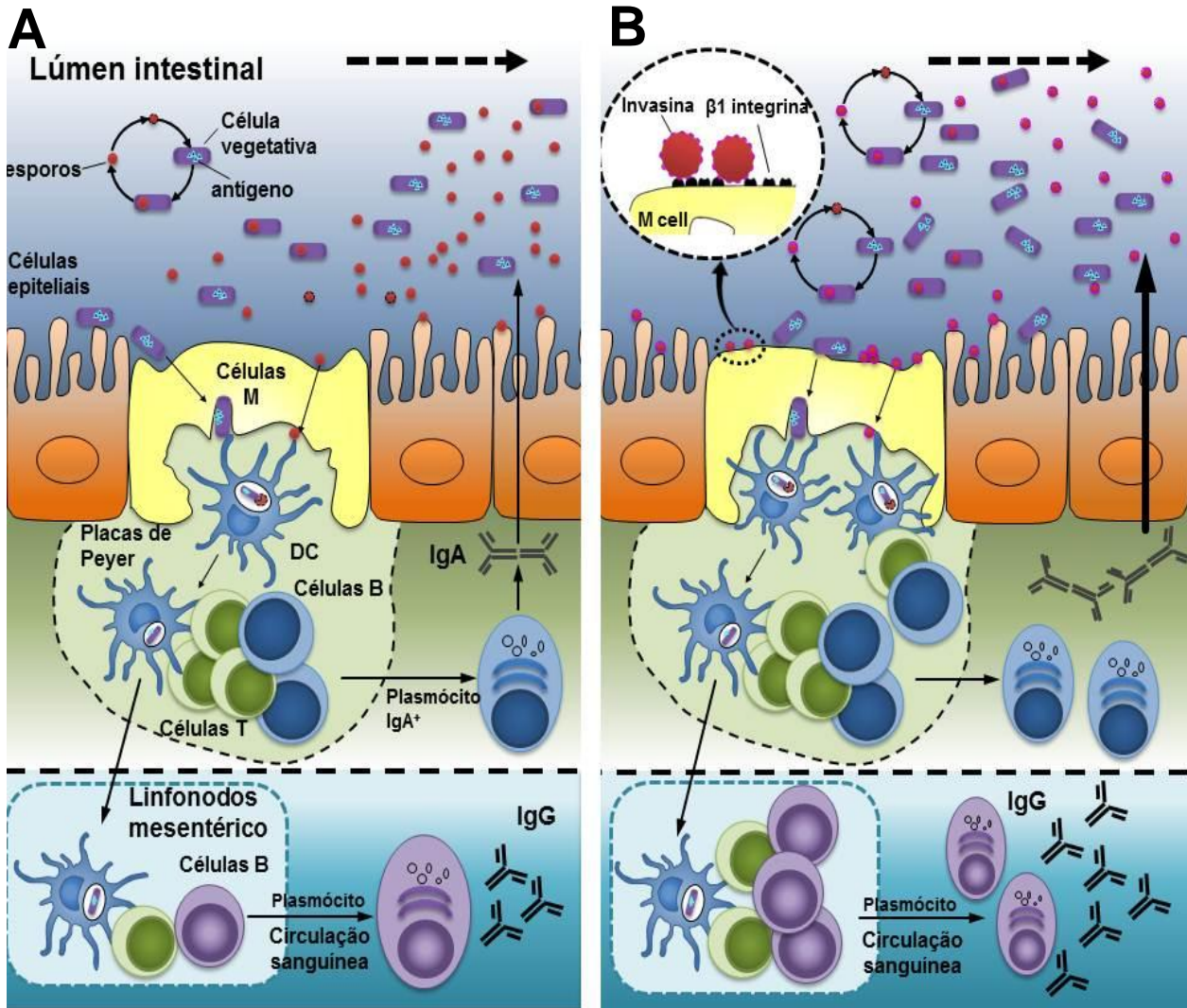
Na figura 16 apresentamos uma teoria para o comportamento e processamento diferencial que ocorre usando a linhagem de esporo adesiva LDV704 após a administração oral. Após a administração oral dos esporos de *B. subtilis* sem adesinas bacterianas na superfície estes esporos podem germinar no lúmen intestinal e o promotor pode ser induzido pelo estresse do ambiente permitindo a expressão e o acúmulo do antígeno alvo nas células vegetativas. Neste momento, as células

vegetativas contendo o antígeno podem ser captadas pelas células epiteliais especializadas, as células M (microfold), nas placas de Peyer ou seguir um novo processo de esporulação e/ou excreção nas fezes. Tanto os esporos quanto as células vegetativas do *B. subtilis* podem ser capturados aleatoriamente pelas células M, no entanto a captura dos esporos necessitará de sua germinação dentro das células dendríticas (DC) permitindo assim a expressão e posterior ativação do sistema imune pela apresentação do antígeno as células B e T. Além disso, as DCs ativadas podem ser drenadas para sítios aferentes e estimular uma resposta sistêmica. Os plasmócitos ativados na mucosa produzirão IgA específicos, o qual será translocado para o lúmen intestinal. Entretanto, em poucos dias este processo será completamente abolido e nenhum antígeno vacinal será capturado e apresentado (Figura 16A).

Contudo, quando a administração oral é feita com os esporos de *B. subtilis* expressando adesinas bacterianas em sua superfície vemos um direcionamento para as células M. Neste sistema os processos são semelhantes àqueles descritos para os esporos não adesivos, contudo a diferença é a interação específica (direcionamento) entre a adesina na superfície dos esporos (InvA) e um receptor celular (β 1-integrina) preferencialmente expresso pelas células M (canto superior esquerdo). Como consequência os esporos adesivos de *B. subtilis* são preferencialmente capturados pelas células M, não mais aleatoriamente capturados. O aumento do número de esporos capturados irá aumentar o número de células DC ativadas resultando em uma forte ativação do sistema imune de mucosa. Além disso, um elevado número de ciclos de esporulação dentro do lúmen intestinal aumenta o tempo de exposição e a quantidade do antígeno exposta ao sistema imunológico (figura 16B).

A proposta descrita abre novos e promissores caminhos para o desenvolvimento de vacinas de mucosa contra a cárie dental usando o *B. subtilis* como veículo vacinal. A estratégia usada e os resultados obtidos foram reunidos no manuscrito intitulado “Anti-caries Vaccine Based on *B. subtilis* Spores with Enhanced Gut Persistence and Expressing the Saliva-Binding Region of the *S. mutans* P1 Protein” e submetidos a publicação à PLoS Pathogens.

Figura 16- Representação esquemática do direcionamento dos esporos de *B. subtilis* para células imunes de mucosa no GALT (*gastrointestinal-associated lymphoid tissue*) e sua consequência para a resposta imunológica ao antígeno alvo.



(A) Sistema de entrega baseado nos esporos sem proteínas adesivas de capa. (B) Sistema de entrega usando os esporos adesivos.

Anti-caries Vaccine Based on *B. subtilis* Spores with Enhanced Gut Persistence and Expressing the Saliva-Binding Region of the *S. mutans* P1 Protein

Milene B. Tavares¹, Juliano D. Paccez¹, Renata D. Souza¹, Mariela E. O. Silva¹, Rafael C.M. Cavalcante², Wilson B. Luiz¹, Eduardo G. Martins¹, Rita C.C. Ferreira¹ and Luís C.S.Ferreira^{1,*}.

¹Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

² Vaccine Development Laboratory, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Running title: Gut persistence and delivery by *B. subtilis* spores

Key words: anti-caries vaccines, *Bacillus subtilis* spores, bacterial adhesins, *Streptococcus mutans*, P1 protein.

*Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Lineu Prestes Av. 1374, ZIP CODE: 05508-900, São Paulo, SP. Phone: (+55-11) 3091-7338. Fax: (+55-11) 3091-7354. e-mail: lcsf@usp.br

Abstract

The purpose of the present study was the development of a new anti-caries vaccine based on the mucosal administration of recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing surface-exposed bacterial adhesins (SlpA of *Lactobacillus brevis* or InvA of *Yersinia pseudotuberculosis*). The spores were genetically fused with an outer spore coat protein (CotB) and an intracellular protein, expressed after spore germination, encompassing the saliva-binding domain of the P1 protein (P1₃₉₋₅₁₂) from *Streptococcus mutans*, the major etiological agent of dental caries. The recombinant spores showed enhanced adhesion to Caco-2 cells and persisted for up to 8 days longer than regular spores in the gastrointestinal tract, particularly at Peyer's patch cells, of orally dosed mice. Expression of P1₃₉₋₅₁₂ was observed in vegetative cells after spore germination, while the recombinant bacterial adhesins were recovered only from the spore coat of the recombinant strains. Oral immunization of BALB/c mice with the recombinant spores resulted in higher systemic and mucosal antibody responses to the P1₃₉₋₅₁₂ antigen than in mice immunized with spores without surface-exposed adhesins. Mice immunized via the intranasal or sublingual routes with adhesin-expressing spores showed further enhancement of the induced P1-specific serum antibody responses. In addition, anti-P1₃₉₋₅₁₂ antibodies raised in mice immunized with the recombinant spores efficiently blocked the adhesion of *S. mutans* to immobilized salivary agglutinins without interfering with saliva-induced bacterial aggregation, a non-immune defense mechanism. In conclusion, our study demonstrates that the expression of bacterial adhesins on the surface of recombinant *B. subtilis* spores enhances their interaction with gut epithelial cells and improves antigen delivery to mucosa-associated lymphoid tissues. Moreover, the present results represent a relevant step toward the use of *B. subtilis* spores as vaccine delivery vectors and offer interesting prospects for the development of anti-caries vaccines.

Author Summary

The human dental caries is an infectious disease with worldwide distribution mainly caused by the bacterium *Streptococcus mutans*. After decades of intense research in anti-caries vaccines a few encouraging results were obtained due to the lack of an adequate delivery system for antigens with preserved immunogenicity. In the present study we propose a new antigen delivery approach based on spores of *Bacillus subtilis*, a nonpathogenic bacterium used for centuries in eastern cultures to combat diseases of the gastrointestinal tract such as diarrhea, genetically modified to persist longer in the mammalian gut and, after germination, express a saliva-binding domain of a *S.mutans* surface protein involved with adhesion to the tooth surface. The results indicated that mice immunized with the recombinant spores increased the production of protective antibodies both in blood and saliva. Moreover, the induced antibody responses efficiently block the adhesion of *S. mutans* to abiotic surfaces representing a non-invasive alternative for prevention of dental caries.

INTRODUCTION

Bacterial carriers for the mucosal delivery of antigens have been intensively investigated as an approach for the development of vaccines against a large spectrum of infectious diseases, particularly those caused by pathogens capable of colonizing or invading the mucosal epithelium [1–3]. The most common live bacterial vaccine vectors are based on attenuated pathogens, such as *Salmonella* and *Listeria*, but the potential risk of reversion to the virulent phenotype has reduced the interest in these vectors as general platforms for the development of vaccine formulations, particularly for humans [4-8]. Non-pathogenic commensal bacteria, such as lactic acid gram-positive bacteria, are a safer alternative for the development of mucosal-delivered vectors, but their inherently lower immunogenicity, particularly after oral administration, remains as a drawback [9-11] .

Among the non-pathogenic gram-positive bacteria with a safe record of use as antigen-delivered vectors lie some *Bacillus subtilis* strains with the attractive feature of forming heat-resistant endospores, the most resilient life form in nature. These strains show diverse biotechnological applications, including as probiotics, in the production of

spicy foods and for the expression of diverse recombinant proteins [10, 12-17]. In addition, several reports have demonstrated that *B. subtilis* spores or vegetative cells can be used successfully as live carriers of vaccine antigens. In one approach, the heterologous protein is expressed on the surface of the recombinant spore as a fusion with a surface-exposed spore coat protein, such as CotB, CotC or CotG [16, 18 -23] . Such a strategy would allow better presentation of the passenger antigen to the mucosal-associated lymphoid tissue (MALT) afferent sites, leading to the induction of adaptive immune responses such as mucosal secretory (IgA) or systemic (IgG) antigen-specific antibody responses [24, 25].

A second expression approach successfully used to generate *B. subtilis* spores as vaccine vectors is based on a distinct rationale and employs episomal plasmids in which the recombinant gene is expressed under the control of promoters active only at the vegetative cell stage immediately after spore germination [12, 26, 27]. This antigen delivery approach relies on the fact that *B. subtilis* spores germinate during transit through the gastrointestinal tract and after engulfment by antigen presenting cells [28-30]. Such recombinant spores have been shown to induce antigen-specific mucosal (fecal IgA) and systemic (serum IgG) responses after mucosal (nasal and oral) administration to mice [12, 26, 27].

Despite the initial optimism regarding the use of *B. subtilis* spores as vaccine delivery vectors, the immunogenicity of the passenger antigens, particularly following oral administration, was lower than those achieved with attenuated viral or bacterial vectors [10]. Indeed, several factors may contribute to the reduced immunogenicity of *B. subtilis* spores, particularly after delivery via the oral route. The frequent exposure to spores present in ingested food and water may lead to immunological tolerance and result in the development of immunosuppressive mechanisms that reduce or block the induction of stronger immune responses to spore proteins and associated antigens [25, 30]. Another factor that certainly affects the immunogenicity of *B. subtilis* spores, although it has not been fully evaluated, is the rapid transit through the gastrointestinal tract following oral administration. Despite evidence that *B. subtilis* spores germinate during transit through the mammalian gut [29, 30], orally administered *B. subtilis* cells or spores are totally cleared from the murine gut in less than 72 hours, which reduces

the chance of productive interactions with gut-associated lymphoid tissue (GALT) cells such as Peyer's patch M cells.

Previous evidence indicated that the expression of proteins that adhere to epithelial cell receptors delays the transit of recombinant bacteria through the gastrointestinal tract, particularly when these proteins are expressed on gram-positive bacterial species unable to colonize the mammalian gastrointestinal tract [31-33]. In support of these findings, recombinant *Lactococcus lactis* strains constructed to express the *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A showed an enhanced ability to bind and invade mammalian cells and to more efficiently deliver a DNA vaccine vector [33]. Until now, this approach has not been applied to other non-invasive gram-positive bacterial species such as *B. subtilis*. *Streptococcus mutans* is the etiological agent of dental caries, the most widespread infectious disease of humans. The ability of *S. mutans* to cause disease is heavily dependent on colonization of the dental surface and encompasses two well-established stages, one reversible and the other irreversible. The irreversible stage involves several proteins such as glycosyltransferases and glucan-binding proteins and the secretion of extracellular glucan that leads to biofilm formation by *S. mutans*. The initial and reversible colonization step is mainly dependent on a single *S. mutans* cell wall protein, the P1 protein (also known as antigen I/II, Pac or antigen B) and its receptor, gp340, a protein found free in the saliva or attached to the tooth surface [34 - 38]. The P1 protein is the major *S. mutans* surface protein, and orthologs are present in other pathogenic streptococci such as *S. agalactiae* and *S. pyogenes* [39]. Therefore, the presence of a functional P1 protein and its binding to the salivary agglutinin represents a major determinant of bacterial fate in the oral environment. If the bacterium binds successfully to the tooth surface and starts to secrete polysaccharides and acids, the process of tooth decay begins. However, if the bacterium binds to soluble salivary components, it agglutinates and washes away with the flow of saliva [40-43]. Indeed, the P1 protein has been the major target for the development of anti-caries *S. mutans* vaccines [44-46].

In the present study, we evaluated a new anti-caries vaccine approach based on recombinant *B. subtilis* strains genetically modified to express a P1-derived domain

(P1₃₉₋₅₁₂), directly involved in the binding of salivary components and previously shown to induce antibodies that can efficiently block the adhesion of *S. mutans* to saliva-treated abiotic surfaces (Tavares et al., 2010). In addition, we investigated if the expression of bacterial adhesins on the spore surface could delay the transit of spores after oral dosing of mice and, more relevantly, increase the immunogenicity of the passenger antigen derived from *S. mutans* (P1₃₉₋₅₁₂).

RESULTS

Engineering *B. subtilis* strains to express bacterial adhesins on the spore surface and the P1₃₉₋₅₁₂ as an intracellular antigen in vegetative cells

To demonstrate that *B. subtilis* spores endowed with the ability to recognize and bind host gut cell receptors could enhance the immunogenicity of a passenger antigen, we engineered three strains expressing three different bacterial adhesins as C-terminal fusions with CotB, one of the most abundant *B. subtilis* surface-exposed spore coat proteins. As a passenger antigen, we employed a plasmid-encoded N-terminal fragment of the *S. mutans* P1 protein (P1₃₉₋₅₁₂), previously shown to preserve functional and immunological features of the native protein [15], expressed under the control of a stress-inducible promoter active only after spore germination [26, 27]. Three integrative vectors encoding the N-terminal portion of CotB genetically fused with the *L. brevis* SlpA adhesin (pLDV703), the *Y. pseudotuberculosis* InvA (pLDV704) or the InvA invasin-binding domain, named InvA₆₀₀, (pLDV705) were introduced into the *B. subtilis* 1012 strain. The resulting strains were transformed with the pLDV02 vector encoding the P1₃₉₋₅₁₂ antigen and named LDV703 (SlpA-derivative), LDV704 (InvA-derivative) and LDV705 (Inv600-derivative) (Figure 1).

The expression of SlpA, InvA or InvA₆₀₀ on the surface of the recombinant *B. subtilis* spores was confirmed by extracting spore coat proteins and testing them in *Western blots* with SlpA- or InvA-specific polyclonal sera. As shown in Fig. 2A, single protein bands with the expected molecular weights were detected in the immunoblots prepared with spores of strains LDV703 (a 54 kDa protein reacting with the anti-SlpA serum), LDV704 (a 137 kDa protein reacting with the anti-InvA serum) and LDV705 (a 54 kD protein reacting with the anti-InvA serum). No protein reaction with the anti-SlpA

and anti-InvA sera was detected in spore coat extracts of the *B. subtilis* LDV02 strain or with the recombinant strains (Fig. 2A). Similarly, no protein reaction with the anti-SlpA and anti-InvA sera were detected in immunoblots prepared with vegetative cells (data not shown). In contrast, immunoblots carried out with whole cell extracts of vegetative cells incubated at 42 °C for 3.5 h and incubated with the anti-P1₃₉₋₅₁₂ serum revealed a single protein band with a molecular weight of 47 kDa, as expected for P1₃₉₋₅₁₂, in all tested strains, including the LDV02 strain (Fig. 2C). The P1₃₉₋₅₁₂ produced by the recombinant strains, quantified by dot blots, showed that 10⁸ CFU of the LDV702 and LDV703 strains carried approximately 56.7 µg of the antigen. The LDV704 and LDV705 strains expressed lower amounts of the P1₃₉₋₅₁₂, and 10⁸ CFU were loaded with approximately 5.6 µg of the antigen under the same inducing conditions (Fig. 2D). No reaction with the anti-P1₃₉₋₅₁₂ serum was detected in spore-coat extracts of any tested recombinant *B. subtilis* strains (data not shown). In contrast, the recombinant spores were specifically labeled with anti-adhesin antibodies, as demonstrated by immunofluorescence analyses (Fig. 2B), confirming that the recombinant bacterial adhesins were expressed only at the spore surface. As expected, no significant labeling was observed with spores of the LDV702 strain treated with anti-SlpA or anti-InvA sera.

Adhesins expressed on the surface of the *B. subtilis* spores are functional

Adhesins expressed on the spore surface were still capable of recognizing and binding their respective receptors. Spores of the *B. subtilis* LDV703, LDV704 and LDV705 strains bound to the human intestinal cell line (Caco-2), as demonstrated in Figure 3. All three types of recombinant spores interacted much more efficiently with the Caco-2 cells than did spores of the LDV02 strain, as the numbers of recovered spores of the LDV03, LDV04 and LDV05 strains were at least three orders of magnitude higher than those of the LDV702 strain (Figure 3A).

Adhesin expression delays gut transit and enhances the interaction of spores with murine GALT

We also evaluated if the expression of the bacterial adhesins on the spore surface would affect their transit through the intestinal tract of mice. For that purpose, we dosed adult Balb/c mice with a single oral load containing 10^{11} spores and followed the number of spores secreted daily in the feces. As shown in Figure 3B, spores of the *B. subtilis* LDV02 strain were detected up to 72 h after dosing. In contrast, mice treated with spores of the recombinant strains secreted a large number of spores ($> 10^3$ spores/g feces) even after 8 days following the oral administration. Indeed, both the numbers of spores as well as the number of vegetative cells recovered were at least three orders of magnitude higher in the feces of mice treated with spores of the recombinant strains compared with those treated with spores of the parental strain. Furthermore, the ratio of vegetative cells to spores was higher in the recombinant strains than in the parental strain (Table 2). There were no significant differences in the numbers of secreted spores, vegetative cells and persistence in the gut between the three recombinant *B. subtilis* strains. Altogether, these results indicate that the expression of bacterial adhesins on the spore coat enhances the interaction of *B. subtilis* spores with the mouse gut epithelium.

To probe the specific interaction of *B. subtilis* with afferent sites of the murine GALT, we measured the number of spores associated with PP in mice orally dosed with spores of the different *B. subtilis* strains. As shown in Figure 3C, the spores and cells of all tested *B. subtilis* strains were detected in PP one day after oral dosing. In contrast, six days after the oral dosing, no spores or vegetative cells were detected in mice treated with the LDV702 strain, but positive results were obtained in mice orally dosed with the spores of the LDV703, LDV704 or LDV705 strains (Fig. 3D). These results indicate that the expression of bacterial adhesins on the spore-coat enhanced the interaction of *B. subtilis* spores with afferent sites within the murine GALT.

Induction of systemic and mucosal anti-P1 antibody responses in mice orally immunized with recombinant *B. subtilis* spores

To determine if the expression of bacterial adhesins would increase the immunogenicity of an antigen carried by *B. subtilis* as a vaccine vector, we employed an expression system in which the passenger antigen was expressed at the vegetative state immediately after spore germination under the control of the stress-inducible *PgsiB* promoter [26]. As a model antigen, we engineered a protein fragment encompassing the saliva-binding domain of the *S. mutans* P1 protein (P1₃₉₋₅₁₂) [15]. As shown in Figure 4A, oral immunization with spores of the *B. subtilis* LDV703 and LDV704 strains resulted in detectable serum concentrations of anti-P1 IgG antibodies after a single oral dose (consisting of three consecutive daily doses) of the recombinant strains, while there was no measurable response in the mice immunized with the parental LVD702 strain. Similar findings were detected after the second spore administration, as all of the mice immunized with the recombinant spores showed higher serum anti-P1₃₉₋₅₁₂ IgG responses than the mice immunized with the LDV702 strain. However, after the third dose, only the mice immunized with spores of the LDV705 strain showed P1-specific IgG levels higher than those detected in the mice immunized with spores of the LDV702 strain. Indeed, the mice immunized with spores of the LDV703 and LDV704 strains showed a decrease in the concentration of serum anti-P1₃₉₋₅₁₂ IgG after the third spore dose, which was not observed in the mice immunized with spores of the LDV702 and LDV705 strains (Fig. 4A).

The mice immunized with the parental *B. subtilis* LDV702 strain did not develop measurable P1-specific salivary IgA responses. In contrast, the mice immunized with the recombinant spores expressing bacterial adhesins induced a clear P1-specific salivary IgA response after the third spore dose (Fig. 4B). These results indicate that systemic, and particularly secreted, antigen-specific antibody responses can be significantly improved in mice immunized with recombinant *B. subtilis* spores expressing SlpA, InvA or InvA600 on the spore-coat surface.

P1-specific sera raised in mice immunized with *B. subtilis* spores inhibit *S. mutans* SAG-mediated adherence but do not interfere with SAG-mediated bacterial aggregation

Anti-P1 sera raised in mice immunized with *B. subtilis* strains expressing P1₃₉₋₅₁₂ were tested for the ability to inhibit the adherence of *S. mutans* to immobilized SAG and to interfere with SAG-mediated *S. mutans* aggregation. Serum samples of mice immunized with spores of the LDV702 strain inhibited the adherence of the *S. mutans* NG8 strain by approximately 15%. In contrast, serum samples collected from mice immunized with spores of the *B. subtilis* LDV703 or LDV704 strains blocked the adherence of *S. mutans* to immobilized SAG by approximately 31% and 34%, respectively. Serum samples collected from mice immunized with spores of the LDV705 strain inhibited the adherence of *S. mutans* cells to SAG less efficiently, with values of approximately 17% (Figure 4C). We also tested the ability of the serum samples to interfere with the P1-dependent *S. mutans* aggregation with soluble SAG. As shown in Figure 4C, the serum samples of mice immunized with the LDV703, LDV704 or LDV705 strains inhibited the aggregation of *S. mutans* cells less efficiently than serum samples from mice immunized with the parental LDV702 strain. Considering the functional features of the anti-P1 antibodies elicited in mice immunized with spores, we selected spores of the LDV704 strain, which expresses Inva at the spore-coat, for further experiments regarding both the induction of antibodies capable of blocking SAG-mediated adhesion concomitant with the lower interference with *S. mutans* aggregation.

Enhanced P1-specific serum antibody responses in mice immunized with *B. subtilis* LDV704 spores via the sublingual or nasal routes

We also evaluated if the use of two different mucosal administration routes, sublingual (s.l.) and intranasal (i.n.), would affect the P1-specific antibody responses induced in mice immunized with the recombinant *B. subtilis* spores. Groups of BALB/c mice were immunized via the s.l. or i.n. routes with three single doses containing 10⁸ spores of the LDV704 strain or the control LDV702 strain. Immunization of mice with spores of the LDV702 strain by either of the two tested administration routes resulted

in a significant increase in the concentration of P1-specific serum IgG compared to the mice immunized with spores of the same strains delivered orally (Fig. 5A and 5C). After the third spore dose, the mice immunized with spores of the LDV704 strain via the s.l. or i.n. routes showed P1-specific serum IgG levels of approximately 1.5×10^3 $\mu\text{g/ml}$ and 2×10^3 $\mu\text{g/ml}$, respectively, while the mice immunized with the same spore dose by the oral route showed a serum concentration of approximately 2.5×10^2 $\mu\text{g/ml}$ of P1-specific IgG at the end of an immunization regimen consisting of three daily, consecutive oral doses of 5×10^{10} spores each (Fig. 4 and 5). A similar enhancement of the P1-specific serum IgG responses was also observed in mice immunized with spores of the LDV702 strain after administration via the s.l. or i.n. routes compared to mice immunized orally with the same strain. However, in contrast to the results obtained after oral administration of the recombinant spores, P1-specific IgA was not detected in the saliva of mice immunized via the s.l. and i.n. routes (data not shown). We also evaluated if the P1-specific serum antibodies raised in mice immunized via the s.l. or i.n. routes would inhibit the adherence of *S. mutans* to immobilized SAG as previously observed with mice immunized via the oral route. As shown in Figures 5B and 5D, the administration of spores of the LDV702 and LDV704 strains by these alternative administration routes improved the blockage of *S. mutans* adhesion to immobilized SAG with values of 47% and 42.5% binding inhibition with sera collected from mice immunized via the s.l. or i.n. routes, respectively, in contrast to 34% binding inhibition with serum samples collected from mice immunized orally with spores of the LDV704 strain. In addition, there was a drastic reduction in the SAG-mediated bacterial aggregation of P1-specific serum antibodies collected from mice immunized via the s.l. and i.n. routes compared to mice immunized orally, which would aid in the elimination of *S. mutans* cells by the saliva. These results indicate that administration of *B. subtilis* spores via the s.l. and i.n. routes of immunization further enhanced the induction of antigen-specific immune responses to the target antigen.

DISCUSSION

Despite the advantages of *B. subtilis* spores as live vaccine vehicles for mucosal delivery of antigens, the lack of efficient colonization of the mammalian gastrointestinal tract (GIT) was considered to be one of the factors associated with the low immune responses observed after delivery of spores via the oral administration route [10]. We reasoned, therefore, that engineered *B. subtilis* spores that could persist longer within the mammalian GIT and interact more efficiently with MALT afferent sites would improve the adjuvant properties of a passenger antigen. To specifically address this question, we generated different *B. subtilis* strains to fuse bacterial adhesins known to bind different receptors at the gut epithelium to a spore-coat protein (CotB). To accomplish this aim, the N-terminal region of the S-Layer protein (SlpA) from *L. brevis* and invasin (full-length, InvA, or the receptor-binding region, InvA₆₀₀) from *Y. pseudotuberculosis* were expressed on the surface of *B. subtilis* spores, giving them the ability to persist longer in the murine gut. We also evaluated the impact of such an acquired property on the immune responses elicited in mice immunized via the oral route. For this purpose, the *B. subtilis* spores were further engineered to encode a fragment of a major surface protein (P1) of *S. mutans*, the main etiological agent of dental caries. Our results clearly showed that adhesive spores, particularly those expressing InvA, enhanced the antigen-specific antibody responses, particularly salivary IgA, to the target *S. mutans* vaccine antigen compared to spores encoding the same antigen but not engineered to express the surface-expressed adhesins. In addition, functional evaluation of sera collected from mice immunized orally with *B. subtilis* spores revealed that the anti-P1 antibodies raised in mice immunized with the recombinant spores efficiently block the adhesion of *S. mutans* to SAG with reduced interference in the SAG-mediated aggregation of bacterial cells, a non-immune protection mechanism that helps the host to eliminate the bacterial cells without causing damage to the teeth. Altogether, the present results demonstrate that the expression of bacterial adhesins on the spore surface enhances the interactions with the gut epithelia and, more relevantly, improves the immunogenicity of antigens carried by recombinant *B. subtilis* spores.

Among several adhesins capable of recognizing receptors on enterocytes, we focused on the *L. brevis* SlpA and *Y. pseudotuberculosis* InvA, which have previously been shown to be functional when expressed in heterologous bacterial host [31, 47-50]. In our study, we showed that *B. subtilis* spores expressing recombinant adhesins on the spore-coat surface dramatically changed their behaviors *in vitro* and *in vivo*. *B. subtilis* is generally considered unable to colonize the mammalian gastrointestinal tract [29]. Ingested spores are readily eliminated in the feces, reducing the chance of productive interactions with the MALT afferent sites and negatively affecting the mounting of antigen-specific immune responses. Expression of SlpA or InvA on the spore-coat surface extended the gut transit period and enhanced the interaction of spores and vegetative cells with GALT afferent sites (PP). Interestingly, expression of InvA or SlpA at the spore surface increased the number of excreted spores by at least three orders of magnitude, indicating that these recombinant spores experienced several germination, replication and sporulation cycles. The ability to persist longer in the gut environment also affected the relative number of cells in relation to spores, a fact that would favor the expression of the target antigen, which is expressed only at the vegetative stage, and the induction of antigen-specific immune responses. These results indicate that the recombinant *B. subtilis* spores could interact more efficiently with the mouse gut epithelia and, when coupled to an antigen expression system active in vegetative cells, positively modulate both the quantity and quality of the induced immune responses to a passenger antigen after oral administration to mice. Despite numerous anti-caries vaccine studies using the multifunctional *S. mutans* P1 protein as the target antigen, only a few reports have described promising results that could lead to an effective anti-caries vaccine [51-55]. In part, the failure to achieve effective immune responses capable of blocking the adhesion of *S. mutans* to the tooth surface may be attributed to the quality of the recombinant antigen, usually produced in *E. coli* strains, which may not show conformational epitopes required for the generation of antibodies that can properly recognize and neutralize the native protein expressed by the oral pathogen. Previous evidence has indicated that the immunization of mice with a recombinant P1-derived protein, encompassing the SAG-binding region and produced in *B. subtilis*, induced antibodies capable of efficiently

blocking the binding of *S. mutans* to SAG without significantly affecting SAG-mediated bacterial agglutination [15]. In the present study, we further demonstrated that the expression of P1₃₉₋₅₁₂ in *B. subtilis* preserves important conformational and immunological features of the antigen required for the generation of effective systemic (serum IgG) and local (salivary IgA) immune responses that prevent the P1-mediated adhesion of *S. mutans* to abiotic surfaces, the first and most important step required for biofilm formation and generation of dental plaque. Remarkably, the immune responses achieved with orally delivered *B. subtilis* spores were superior than those observed with recombinant attenuated *S. typhimurium* strains encoding the P1 saliva-binding region (SBR) alone or genetically linked with the cholera toxin (CT), a powerful mucosal adjuvant [56]. Of particular relevance was the induction of salivary IgA against the target antigen, observed only in mice immunized with adhesin-expressing spores. The induction of P1₃₉₋₅₁₂-specific IgA antibodies in the saliva of mice immunized with adhesive *B. subtilis* spores is similar only to previous results obtained with recombinant *S. typhimurium* strains associated with strong mucosal adjuvants, such as CT [52, 56, 57]. Thus, the generation of P1₃₉₋₅₁₂-expressing *B. subtilis* spores endowed with enhanced gut persistence represents a safe and efficient tool for the development of effective mucosal anti-caries vaccines with several advantages over the presently available technologies designed for the same purpose.

The fate of *S. mutans* in the oral environment relies on a delicate balance that dictates whether the bacterium will bind to the tooth surface or will be washed away by the flow of saliva. Bacterial adhesion to the tooth surface and aggregation rely on both bacterial elements, particularly the SBR domain of the P1 protein, and host defense mechanisms, such as P1-specific antibodies [38, 58, 59]. Thus, a desirable anti-caries vaccine should prevent the adherence of the bacterium to the tooth surface without inhibiting the aggregation process. The observation that expression of the P1₃₉₋₅₁₂ antigen by recombinant spores resulted in antibodies with enhanced properties to block binding of *S. mutans* to the abiotic surface with reduced interference with auto-aggregation raises the possibility of using this antigen as a more efficient alternative to the SBR domain, previously tested as the most promising anti-caries vaccine antigen

[51, 60-62]. Remarkably, the mice with the most efficient adhesion-blocking antibodies also showed lower aggregation effects, as demonstrated with the results obtained in mice immunized via alternative mucosal administration routes (s.l. or i.n.). Although the distinction between the structural features of the P1 protein involved in binding to the tooth surface or aggregation is presently unknown [58], our results clearly demonstrate that both determinants are present in the P1₃₉₋₅₁₂ antigen.

Immunization of mice with recombinant *B. subtilis* spores via the s.l. or i.n. administration routes enhanced the antigen-specific antibody responses compared to the oral route. Although the expression of adhesins on the spore surface significantly improved the immunogenicity of the P1₃₉₋₅₁₂ antigen following oral administration, a rather high number of doses (9) and a high amount of spores per dose (10^{10} spores) were required to induce both systemic and mucosal immune responses. In addition, a clear drop was observed in the antigen-specific serum antibody responses after the second dose with orally delivered spores, as is frequently observed in mice immunized with recombinant *B. subtilis* spores [12, 26, 63]. Thus, alternative administration routes were explored for the more efficient use of bacterial spores as antigen delivery vectors. Mice immunized via the s.l. and i.n. routes with only three doses containing 10^8 viable spores elicited significantly higher serum anti-P1₃₉₋₅₁₂ responses than those immunized orally. Previous studies have demonstrated that the sublingual administration of recombinant *B. subtilis* vegetative cells enhances the induced immune responses to a passenger antigen [64, 65]. However, in contrast to the results obtained with *B. subtilis* cells, no antigen-specific salivary IgA was detected in mice immunized by the s.l. or i.n. routes. This result may reflect a specific feature of the *S. mutans* SBR antigen that requires the administration of higher antigen loads to trigger salivary IgA responses [66].

The administration of *B. subtilis* spores by alternative administration routes also increased the blocking of the adhesion to abiotic surfaces by *S. mutans* cells with minimal interference in the SAG-mediated bacterial aggregation. Because anti-caries protection has been ascribed both to salivary IgA and serum IgG by exudation in the crevicular fluid [66, 67], the administration of recombinant spores delivered via the s.l. route remains a promising alternative for the development of effective anti-caries

vaccines. These findings further emphasize the usefulness of the s.i. route for the administration of vaccine antigens, either as soluble proteins or expressed by recombinant *B. subtilis* strains [64, 65, 68].

Two experimental approaches may be used to generate *B. subtilis* spores as live vaccine vectors, one based on the expression of the target antigen as a fusion protein at the spore-coat [14, 21, 22, 29, 69] and the other based on the expression at the vegetative cell stage after spore germination [12, 26, 27]. The present results represent the first demonstration that a combination of the two antigen expression strategies, spore surface display and episomal vectors active in vegetative cells, can enhance the antigen immunogenicity after mucosal administration of spores. The discovery that the immunological performance of *B. subtilis* spores as antigen delivery vectors can be significantly improved by expressing bacterial adhesins, particularly InvA, on the spore surface may therefore be considered the basis of a new generation of spore-based antigen-delivery vectors endowed with enhanced adjuvant effects and compatible with administration via different mucosal routes. Thus, the proposed antigen expression strategy, in conjunction with the expression of *S. mutans* antigens with preserved immunological features, opens new and promising avenues for the development of anti-caries vaccines.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *E. coli* and *B. subtilis* strains were routinely cultivated in Luria Bertani (LB) broth at 37 °C under aeration. *B. subtilis* spores were obtained from cultures prepared in Foerster medium [70] kept under aeration (200 rpm) at 37 °C for 10 days. The *S. mutans* NG8 strain (kindly provided by Dr L. Jeannine Brady, University of Florida, Gainesville) was cultivated in Todd Hewitt broth and yeast extract (0.5%) (THYE) at 37 °C in 5% CO₂. Antibiotics were added to the growth media according to the strain and plasmid used. Competent *E. coli* cells were prepared after incubation with CaCl₂ according to established procedures [71]. Natural *B. subtilis* competent cells were obtained by the two-step transformation method [72].

Construction of the *B. subtilis* strains expressing adhesive proteins on the spore surface

The genes encoding the full-length *Yersinia pseudotuberculosis* InvA or the receptor-binding domain, which interact with the β 1 integrin receptor and promote the invasion of the gut epithelium cells [47, 48, 49, 73], and the *L. brevis* S-layer protein (SlpA), directly involved in the binding to fibronectin and conferring the capability to colonize the mammalian gut [50, 74], were fused to the gene encoding the N-terminal portion of the CotB protein, which was previously used to expose heterologous proteins at the *B. subtilis* spore-coat surface [69]. Three integrative vectors, derived from pDG1731 [75] and encoding gene fusions encompassing *cotB* and *slpA*, *invA* or the C-terminal receptor-binding domain of *invA* (*inv600*) [47], were constructed (Fig. 1). The sequence encoding the *cotB* promoter and part of the N-terminal (275 amino acids) region was amplified using the primers CotB5, 5'-ggccatggatccacggattaggccgtttgtcc-3' (*Bam*HI site underlined) and CotB3, 5'-ggccataagcttggatgattgatcatctgaagatt-3' (*Hind*III site underlined). The amplified PCR product (831 bp) was inserted into the pDG1731 vector, previously cleaved with *Bam*HI and *Hind*III, giving rise to the pDGcotB vector. In a second step, the genes encoding the adhesive proteins were cloned. The *slpA* encoding gene was amplified from genomic DNA of *L. brevis* using the primers SlpAFw, 5'- CAACGACTGCTAAAGCTTATGAAGTCATACGCT-3' (*Hind*III site underlined) and SlpARv, 5'-ggccatgaattccgttatcgttggtggc-3' (*Eco*RI site underlined). The gene encoding the full length *invA* gene was amplified from the genomic DNA of *Y. pseudotuberculosis* using the primers InvAFw, 5'-atattccctaaagcttgtacctacgctgaccggt-3' (*Hind*III site underlined) and InvA3, 5'-ggccatgaattctattgacagcgcacagagcg-3' (*Eco*RI site underlined), while the sequence encoding the C-terminal receptor-binding domain of InvA, named *inv600*, was obtained with the primers InvA5, 5'- ggccataagcttctttccagccaatcagtga-3' (*Hind*III site underlined) and InvA3. The amplified PCR products (662 bp for *slpA*, 2.9 kb for *invA* and 582 bp for *inv600*) were digested with the restriction enzymes *Hind*III and *Eco*RI and cloned into pDGcotB, which had previously been digested with the same enzymes. After selection and screening of recombinant clones, the chimeric plasmids carrying the

slpA, *invA* and *inv600*-encoding sequences were named pSlpA, plnvA and plnv600, respectively (Figure 1A and Table 1). All cloned sequences were confirmed by DNA sequencing. Once generated, each recombinant plasmid was introduced into the *B. subtilis* 1012 strain, and the recombinant clones with insertions at the *thrC* locus were selected according to previously reported conditions [75]. The resultant strains transformed with pSlpA, plnvA and plnv600 were named BsSlpA, BslnvA and Bslnv600, respectively (Figure 1A and Table 1).

The final step in the generation of the vaccine strain consisted of the generation of an episomal vector encoding the *S. mutans* antigen. For this purpose, the *spaP1N* gene encoding the P1₃₉₋₅₁₂ antigen from the *S. mutans* UA159 strain [15] was cloned into the pHCMC03 vector under the control of a stress-inducible promoter (*PgsiB*), active only during the vegetative growth stage [26]. Initially, the pGP1N vector [15] was digested with *Bam*HI and *Aat*II to produce a 1.4 kb fragment and subsequently cloned into pHCMC03, previously digested with the same enzymes, to generate the pLDV702 vector. The correct nucleotide sequence of the cloned insert was confirmed by automated nucleotide sequencing. The pLDV702 vector was introduced into the *B. subtilis* strains BsSlpA, BslnvA and Bslnv600, and one recombinant clone carrying the plasmid was selected and named LDV703, LDV704 and LDV705, respectively. The pLDV702 vector was also introduced into the parental *B. subtilis* 1012 strain, and the resulting strain was named LDV702 (Table 1 and Figure 1B).

Preparation of *B. subtilis* spores

Spores were recovered from cultures prepared in Foerster broth [70] supplemented with chloramphenicol (30 µg/ml) and incubated with aeration (200 rpm) at 37 °C for 10 days. After cultivation, the spores were centrifuged and washed 3 times with sterile distilled water. For oral immunization, the spores were suspended in sodium bicarbonate solution (0.5 M), while for the nasal and sublingual immunizations, the spores were suspended in phosphate buffered saline (PBS). The concentration of viable spores was determined by plating serial dilutions of heat-treated samples (60 min at 65 °C) on LB/chloramphenicol plates. A similar procedure, but without the heat treatment, was employed to determine the total number of viable units (spores and

vegetative cells) of each spore preparation. Under the tested conditions, no contamination with vegetative cells was observed.

Extraction of spore coat proteins

The *B. subtilis* spore coat proteins were extracted after incubation of the spores in 50 mM dithiothreitol (DTT) and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) at 70 °C for 30 min. The spores were harvested at 8,000 xg for 10 min, and the collected soluble fractions were subjected to SDS-PAGE and *Western blot* for subsequent reaction with anti-SlpA or anti-InvA mouse polyclonal antibodies (kindly provided by Dr. Vasco Azevedo at the Federal University of Minas Gerais, Brazil).

SDS-PAGE and Western blots

SDS-PAGE was performed according to standard procedures using a Mini Protean II vertical electrophoresis unit (Miniprotean, BioRad). *Western blots* were performed after the electrophoretic transfer of sorted proteins to nitrocellulose filters. The membranes were treated with buffered saline containing 5% skim milk to block nonspecific protein binding sites and then incubated with sera specific for SlpA, InvA or P1. Reactive bands were detected with a chemiluminescence kit (Super Signal™, Pierce) as previously described [15].

Quantification of P1₃₉₋₅₁₂ expression by recombinant *B. subtilis* strains

P1₃₉₋₅₁₂ expression by the *B. subtilis* vaccine strains was monitored after activation of the *PgsiB* promoter by high temperature incubation, according to previously described conditions [76]. Briefly, cells cultivated in LB broth at 37 °C were shifted to 42 °C at an OD_{600nm} of 0.6 - 0.8 and incubated for an additional period of 3.5 h. The cells were collected and suspended in lysis buffer (30% sucrose, 100 mM Tris-HCl pH 7.2 and 800 µg/ml of lysozyme) for 30 min at 37 °C when SDS (1% final concentration) to lyse the cells. The expression of P1₃₉₋₅₁₂ was measured in whole cell extracts by *Western blots* and dot blots with samples corresponding to different cellular concentrations (ranging from 10⁷ to 10² CFU). Purified P1₃₉₋₅₁₂ (3.2 to 250 ng of protein) was obtained as previously described [15] and used as a reference for the

quantification of protein content in different *B. subtilis* strains. Reactive bands were detected using a chemiluminescent kit (Super Signal™, Pierce) and analyzed using ImageJ software following the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence of recombinant spores

Spores were fixed on glass slides using a previously described protocol [77]. Briefly, the spores were suspended in GTE-lysozyme buffer (50 mM glucose, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA and 2 mg/mL of lysozyme) and applied to glass slides previously treated with 0.01% poly-L-lysine (Sigma). After 5 min, the excess liquid was removed, and the slides were air dried, washed once with PBS and blocked for 30 min with PBS containing 2% bovine serum albumin (BSA). The spore samples were incubated for 1 h with specific anti-SlpA or anti-InvA polyclonal sera, washed 3 times with PBS and incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, U.S.A.) for 1 h. The stained cells were viewed with a Nikon TE300 inverted epifluorescence microscope (495-nm excitation, 525-nm emission).

Spore adhesion to Caco-2 cells

Adhesion of recombinant *B. subtilis* spores to gut epithelial cells was performed using the human Caco-2 colon carcinoma cell line (ATCC number HTB37), according to a previously described procedure [78]. The Caco-2 cells were cultured in RPMI medium supplemented with 2 mM L-glutathione and 20% fetal bovine serum. Spores were added to 24-well plates (Nunc, reference) containing 2×10^5 Caco-2 cells/well at a concentration of 5×10^9 spores/well. The assay was performed with media containing gentamicin (20 µg/mL) to inactivate germinated spores. After 2 h, the wells were washed to remove unbound spores, and the Caco-2 cells were subsequently lysed in a solution containing 0.2% Triton X-100. The lysate was heated at 65° C for 60 min and plated on LB plates with chloramphenicol (30 µg/ml).

Transit of *B. subtilis* spores through the mouse intestinal tract

Groups of five Balb/c mice were inoculated with a single dose of 10^{11} spores for each *B. subtilis* strain tested. The mice were kept in cages for a 9 day period. Each day the animals of each inoculated group were transferred to clean cages without sawdust for

2 h. After this period, the fecal pellets were collected, weighed and diluted in 5 ml of 1X PBS. The samples were centrifuged at 8,000 $\times g$ for 15 min at 4 °C, and the supernatant was saved. Aliquots were serially diluted with PBS and plated before and after incubation for 60 min at 65 °C on LB plates supplemented with spectinomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) and chloramphenicol (30 $\mu\text{g/ml}$). The number of viable bacterial spores and vegetative cells per gram of feces was determined using the following formula: (CFU/ml X 50)/ weight of feces collected. Thus, the total number of spores and cells excreted per mouse in each day represented the average of 5 animals per group.

Adhesion of *B. subtilis* spores to murine Peyer's patches

Groups of 4 Balb/c mice were inoculated with a single oral dose of 5×10^9 spores. After 1 or 6 days, the animals were sacrificed, and the small intestine was removed aseptically. Small samples of the intestine were removed with sterile saline, and the Peyer's patches (PP) were removed. The collected PP were washed and treated with 0.2% Triton X-100 in saline. The whole cell lysates were plated on LB plates containing spectinomycin (100 $\mu\text{g/ml}$) and chloramphenicol (30 $\mu\text{g/ml}$) before and after heat inactivation treatment for the determination of viable vegetative cells and spores.

Immunization regimens

For oral immunization, groups of five 6-8-week-old female Balb/c mice were inoculated with spores of the different *B. subtilis* strains. The mice were immunized with 5×10^{10} spores on days 1, 2, 3, 15, 16, 17, 29, 30 and 31. For nasal and sublingual immunizations, groups of 10 mice between 6 to 8 weeks of age were inoculated with *B. subtilis* 1012, LDV702 or LDV704 strains on days 1, 15 and 29. For the nasal immunizations, the mice received a dose of 10^8 spores in a 10 μl volume in the nares. For the sublingual immunizations, the mice were anesthetized with ketamine (80 mg/kg of body weight) and xylazine hydrochloride (8 mg/kg of body weight) and inoculated with a dose of 10^8 spores in a 10 μl volume under the tongue. Sera samples and saliva were collected one day before the first dose (pre-immune samples) and the day before each new set of doses. Saliva was collected after intraperitoneal (i.p.) injection of 0.5 ml of 0.2% pilocarpine to stimulate the saliva flow. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (1

mM) was added to the samples as a protease inhibitor [79]. All samples were stored at –80 °C.

ELISA

Quantification of antigen-specific antibody titers in the serum and saliva samples collected from immunized mice was performed by ELISA in 96-well MaxiSorp (Nunc) plates coated with the recombinant P1₃₉₋₅₁₂ protein, according to previously described procedures [15]. The absorbance values of pre-immune sera were used as a blank. Dilution curves were drawn for each sample, and the concentrations of antigen-specific antibodies were determined using standard curves prepared with known amounts of mouse IgG and IgA (Southern Biotech). All samples were assayed in duplicate.

Binding of *S. mutans* to immobilized salivary agglutinin (SAG)

Saliva-binding assays with the *S. mutans* NG8 strain were carried out with purified SAG, as described previously [58]. The adhesion of *S. mutans* to immobilized SAG was determined with inhibition binding assays, according to a previously described method [80]. Briefly, SAG diluted in KPBS (2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 6.5 mM Na₂HPO₄, pH 7.2) was adsorbed onto wells (100 µl per well) of an Immobilon (Nunc) microtiter plate at 4 °C for 16 h. The wells were washed once with TBSC (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂; pH 7.6), blocked with 1% BSA for 1 h at 25 °C and washed once again with TBSC. Aliquots (100 µl) of bacterial suspensions (prepared at an OD_{600 nm} of 1 in TBSC) were added to the wells and incubated for 2 h at 37 °C. For inhibition assays, the serum samples were mixed with the bacterial suspension and incubated for 30 min at 37 °C. The suspensions were added to the wells and incubated for 2 h at 37 °C. The wells were washed twice with TBSC, and the adherent bacteria were fixed with 25% formaldehyde for 30 min at 25 °C. The wells were washed twice with TBSC and stained with 0.5% crystal violet at 25 °C for 1 min. Finally, the wells were washed, the dye was dissolved in 7% acetic acid and the absorbance was measured at 600 nm. The inhibition of *S. mutans* NG8 strain adhesion in the presence of immune sera was calculated as follows: $100 - ((\text{Abs}_{600\text{nm}}$

NG8 cells incubated with the tested serum sample x 100)/ Abs_{600nm} NG8 cells not incubated with mouse serum). Sera and serum samples collected from mice immunized with the parental *B. subtilis* 1012 strain were used as negative controls. The concentration of immunoglobulin in all tested sera was kept constant (2 µg/mL). All tests were performed in triplicate and independently repeated at least three times.

Inhibition of agglutinin-mediated aggregation of *S. mutans*

Aggregation and inhibition of aggregation assays of *S. mutans* cells in the presence of the test mouse sera were performed according to a previously described method [58]. Non-immune serum and serum from mice immunized with spores of the *B. subtilis* 1012 strain were used as negative controls. All tested serum samples were collected after the complete immunization regimens and diluted to a final concentration of 2 µg/mL. All tests were performed in triplicate and independently repeated at least three times.

Statistical analyses

The results were analyzed with GRAPHPAD PRISM 5 software and were expressed as the means ± SD. Statistically significant differences ($p < 0.05$) for the Caco-2 cell adhesion test were determined with Student's *t* test, while the *S. mutans* adherence and aggregation inhibition tests were analyzed with one-way ANOVA.

Ethics Statement

All experiments involving animals were performed with prior approval by the committee on the ethical use of laboratory animals from the Institute of Biomedical Sciences of São Paulo University (Protocol #013) and in accordance with guidelines for the care and use of laboratory animals of the National Committee on the Ethics of Research (CONEP).

Acknowledgments

This study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq grants. We thankfully acknowledge the invaluable technical

assistance of Loren C. da Silva, Monica Rodrigues, Naína I. Garcia and Eduardo G. Martins.

References

1. Mestecky J (1987) The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions, *J Clin Immunol* 7: 265–276.
2. Ryan EJ (2001) Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotechnol* 19: 293-304.
3. Bolton DL, Song K, Wilson RL, Kozlowski, PA, Tomaras GD, et al. (2012) Comparison of systemic and mucosal vaccination: impact on intravenous and rectal SIV challenge. *Mucosal Immunol* 5: 41–52.
4. Paglia P, Medina E, Arioli I, Guzman CA, Colombo MP (1998) Gene transfer in dendritic cells, induced by oral DNA vaccination with *Salmonella typhimurium*, results in protective immunity against a murine fibrosarcoma. *Blood* 92: 3172-3176.
5. Darji A, zur Lage S, Garbe AI, Chakraborty T, Weiss S (2000) Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27: 341-9.
6. Loeffler DI, Schoen CU, Goebel W, Pilgrim S (2006) Comparison of different live vaccine strategies *in vivo* for delivery of protein antigen or antigen-encoding DNA and mRNA by virulence-attenuated *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 74: 3946-3957.
7. Loessner H, Endmann A, Leschner S, Bauer H, Zelmer A, et al. (2008) Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. *Int J Med Microbiol* 298: 21-26.
8. Schoen C, Loeffler DI, Frentzen A, Pilgrim S, Goebel W, et al. (2008) *Listeria monocytogenes* as novel carrier system for the development of live vaccines. *Int J Med Microbiol* 298: 45-58.
9. Steidler L, Robinson K, Chamberlain L, Schofield KM, Remaut E, et al. (1998) Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect Immun* 66: 3183-3189.
10. Ferreira LC, Ferreira RC, Schumann W (2005) *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. *An Acad Bras Cienc* 77:113-124.
11. Medina M, Vintiñi E, Villena J, Raya R, Alvarez S (2010) *Lactococcus lactis* as an adjuvant and delivery vehicle of antigens against pneumococcal respiratory infections. *Bioeng Bugs* 1: 313-325.

12. Paccez JD, Nguyen HD, Luiz WB, Ferreira RC, Sbrogio-Almeida ME, et al. (2007) Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. *Vaccine* 25: 4671-4680.
13. Nguyen HD, Phan TT, Schumann W (2007) Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* 55: 89-93.
14. Uyen NQ, Hong HA, Cutting SM (2007) Enhanced immunisation and expression strategies using bacterial spores as heat-stable vaccine delivery. *Vaccine* 25: 356-365.
15. Tavares MB, Silva BM, Cavalcante RCM, Souza RD, Luiz WB, et al. (2010) Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of *Streptococcus mutans* P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 131-142.
16. Ning D, Leng X, Li Q, Xu W (2011) Surface-displayed VP28 on *Bacillus subtilis* spores induces protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administration. *J Appl Microbiol* 111: 1327-1336.
17. Farhat-Khemakhem A, Ben Farhat M, Boukhris I, Bejar W, Bouchaala K, et al. (2012) Heterologous expression and optimization using experimental designs allowed highly efficient production of the PHY US417 phytase in *Bacillus subtilis* 168. *AMB Express* 2: 10.
18. Mauriello EM, Duc le H, Isticato R, Cangiano G, Hong HA, et al. (2004) Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine* 22: 1177-1187.
19. Huang JM, Hong HA, Van Tong H, Hoang TH, Brisson A, et al. (2010) Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine* 28: 1021-1030.
20. Potot S, Serra CR, Henriques AO, Schyns G (2010) Display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores, using a coat-associated enzyme as the carrier. *Appl Environ Microbiol* 76: 5926-5933.
21. Lee S, Belitsky BR, Brinker JP, Kerstein KO, Brown DW, et al. (2010) Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 17: 1647-1655.
22. Lee S, Belitsky BR, Brown DW, Brinker JP, Kerstein KO, Herrmann JE, et al. (2010) Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. *Vaccine* 28:6658-6665.
23. Permpoonpattana P, Hong HA, Phetcharaburanin J, Huang JM, Cook J, et al. (2011) Immunization with *Bacillus* spores expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. *Infect Immun.* 79: 2295-2302.
24. Hong HA, le Duc H, Cutting SM (2005) The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev* 29: 813-835.

25. Ceragioli M, Cangiano G, Esin S, Ghelardi E, Ricca E, et al. (2009) Phagocytosis, germination and killing of *Bacillus subtilis* spores presenting heterologous antigens in human macrophages. *Microbiology* 155: 338-346.
26. Paccez JD, Luiz WB, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira RC, Schumann W, et al. (2006) Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. *Vaccine* 24: 2935-2943
27. Luiz WB, Cavalcante RC, Paccez JD, Souza RD, Sbrogio-Almeida ME, et al. (2008) Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/II fimbriae B subunit. *Vaccine* 26: 3998-4005.
28. Hoa TT, le Duc H, Isticato R, Baccigalupi L, Ricca E, et al. (2001) Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. *Appl Environ Microbiol* 67: 3819-3823.
29. le Duc H, Hong HA, Cutting SM (2003) Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. *Vaccine* 21: 4215-4224.
30. le Duc H, Hong HA, Uyen NQ, Cutting SM (2004) Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. *Vaccine* 22: 1873-1885.
31. Aväll-Jääskeläinen S, Lindholm A, Palva A (2003) Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 69: 2230-2236.
32. Guimarães VD, Gabriel JE, Lefèvre F, Cabanes D, Gruss A, et al. (2005) Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. *Microbes Infect* 7: 836-844.
33. Innocentini S, Guimarães V, Miyoshi A, Azevedo V, Langella P, et al. (2009) *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. *Appl Environ Microbiol* 75: 4870-4878.
34. Russell MW, Lehner T (1978) Characterisation of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. *Arch Oral Biol* 23: 7-15.
35. Russell RR (1979) Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol* 114: 109-115.
36. Forester H, Hunter N, Knox KW (1983) Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol* 129: 2779-2788.
37. Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, Hamada S, Koga T (1989) Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries. *Mol Microbiol* 3: 673-678.

38. Loimaranta V, Jakubovics NS, Hytönen J, Finne J, Jenkinson HF, et al. (2005) Fluid- or surface-phase human salivary scavenger protein gp340 exposes different bacterial recognition properties. *Infect Immun* 73: 2245-2252.
39. Zhang S, Green NM, Sitkiewicz I, Lefebvre RB, Musser JM (2006) Identification and characterization of an antigen I/II family protein produced by group A *Streptococcus*. *Infect Immun* 74: 4200-4213.
40. Ericson T, Rundegren J (1983) Characterization of a salivary agglutinin reacting with a serotype c strain of *Streptococcus mutans*. *Eur J Biochem* 133: 255-261.
41. Malamud D, Appelbaum B, Kline R, Golub EE (1981) Bacterial aggregating activity in human saliva: comparisons of bacterial species and strains. *Infect Immun* 31: 1003-1006.
42. Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H, et al. (1990) Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. *Infect Immun* 58: 289-296.
43. Smith DJ (2002) Dental caries vaccines: prospects and concerns. *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 335-349.
44. Michalek SM, Katz J, Childers NK (2001) A vaccine against dental caries: an overview. *BioDrugs* 15: 501-508.
45. Oli MW, McArthur WP, Brady LJ (2006) A whole cell BIAcore assay to evaluate P1-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to human salivary agglutinin and inhibition by specific antibodies. *J Microbiol Methods* 65:503-511.
46. Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, et al. (2010) The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. *Mol Microbiol* 77: 276-286.
47. Leong JM, Fournier RS, Isberg RR (1990) Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. *EMBO J* 9: 1979-1989.
48. Clark MA, Hirst BH, Jepson MA (1998) M-cell surface B-integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M-cells. *Infect Immun* 66: 1237-1243.
49. Dersch P, Isberg RR (1999) A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. *EMBO J* 18: 1199-1213.
50. Aväll-Jääskeläinen S, Kylä-Nikkilä K, Kahala M, Miikkulainen-Lahti T, Palva A (2002) Surface display of foreign epitopes on the *Lactobacillus brevis* S-layer. *Appl Environ Microbiol* 68: 5943-5951.
51. Toida N, Hajishengallis G, Wu HY, Russell MW (1997) Oral immunization with the saliva-binding region of *Streptococcus mutans* AgI/II genetically coupled to the cholera toxin B subunit elicits T-helper-cell responses in gut-associated lymphoid tissues. *Infect Immun* 65: 909-915.
52. Huang Y, Hajishengallis G, Michalek SM (2001). Induction of protective immunity against *Streptococcus mutans* colonization after mucosal immunization with

- attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing an *S. mutans* adhesin under the control of *in vivo*-inducible nirB promoter. *Infect Immun* 69: 2154-2161.
53. Brady LJ (2005) Antibody-mediated immunomodulation: a strategy to improve host responses against microbial antigens. *Infect Immun* 73: 671-678.
 54. Salam MA, Katz J, Zhang P, Hajishengallis G, Michalek SM (2006) Immunogenicity of *Salmonella* vector vaccines expressing SBR of *Streptococcus mutans* under the control of a T7-nirB (dual) promoter system. *Vaccine* 24: 5003-5015.
 55. Li Y, Yang Y, Bian Z, Chen Z, Fan M (2009) Enhanced immunogenicity of an anti-carries vaccine encoding a cell-surface protein antigen of *Streptococcus mutans* by intranasal DNA prime-protein boost immunization. *J Gene Med* 11: 1039-1047.
 56. Huang Y, Hajishengallis G, Michalek SM (2000) Construction and Characterization of a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Clone Expressing a Salivary Adhesin of *Streptococcus mutans* under Control of the Anaerobically Inducible nirB Promoter. *Infect Immun* 68: 1549-1556.
 57. Wu H, Russell MW (1993) Induction of Mucosal Immunity by Intranasal Application of a Streptococcal Surface Protein Antigen with the Cholera Toxin B Subunit . *Infect Immun* 61: 314-322.
 58. Brady LJ, Piacentini DA, Crowley PJ, Oyston PC, Bleiweis AS (1992) Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of mutans streptococci by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1. *Infect Immun* 60: 1008-1017.
 59. Bikker FJ, Ligtenberg AJM, Nazmi K, Veerman ECI, van't Hof W, et al. (2002) Identification of the bacteria-binding peptide domain on salivary agglutinin (gp-340/DMBT1), a member of scavenger receptor-cystein rich superfamily. *The J Biol Chem* 277: 32109-32115.
 60. Crowley PJ, Brady LJ, Piacentini DA, Bleiweis AS (1993) Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 61: 1547-1552.
 61. Nakai M, Okahashi N, Ohta H, Koga T (1993) Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. *Infect Immun* 61: 4344-4349.
 62. Hajishengallis G, Koga T, Russell MW (1994) Affinity and specificity of the interactions between *Streptococcus mutans* antigen I/II and salivary components . *Dent Res J* 73: 1493-1502.
 63. Yu LH, Cutting SM (2009) The effect of anti-spore antibody responses on the use of spores for vaccine delivery. *Vaccine* 27: 4576-4584.
 64. Amuguni JH, Lee S, Kerstein KO, Brown DW, Belitsky BR, et al. (2011) Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. *Vaccine* 29: 4778-4784.

65. Amuguni A, Lee S, Kerstein K, Brown D, Balitsky B, et al. (2012) Sublingual immunization with an engineered *Bacillus subtilis* strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. *Microbes Infect* 14: 447-456.
66. Russell MW, Wu H (1991) Distribution, Persistence, and Recall of Serum and Salivary Antibody Responses to Peroral Immunization with Protein Antigen I/II of *Streptococcus mutans* Coupled to the Cholera Toxin B Subunit. *Infect Immun* 59: 4061-4070.
67. Challacombe SJ, Russell MW, Hawkes J (1978) Passage of intact IgG from plasma to the oral cavity via crevicular fluid. *Clin Exp Immunol* 34: 417-422.
68. Hervouet C, Luci C, Çuburu N, Cremel M, Bekri S, et al. (2010). Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in mouse female genital tract. *Vaccine* 28:5582-2290.
69. Isticato R, Cangiano G, Tran HT, Ciabattini A, Medaglini A, et al. (2001) Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol* 183: 6294-6301.
70. Foerster HF, Foster JW (1966) Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 91: 1333-1345.
71. Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
72. Cutting SM, Oke V, Driks A, Losick R, Lu S, et al. (1990) A forespore checkpoint for mother cell gene expression during development in *B. subtilis*. *Cell* 62: 239-250.
73. Marra A, Isberg RR (1997) Invasin-dependent and invasin-independent pathways for translocation of *Yersinia pseudotuberculosis* across the Peyer's patch intestinal epithelium. *Infect Immun* 65: 3412-3421.
74. Hynönen U, Westerlund-Wikström B, Palva A, Korhonen TK (2002) Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol* 184: 3360-3367.
75. Guérout-Fleury AM, Frandsen N, Stragier P (1996) Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. *Gene* 180: 57-61.
76. Phan TT, Nguyen HD, Schumann W (2006) Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Protein Expr Purif* 46: 189-195.
77. le Duc H, Hong HA, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM (2003) Bacterial spores as vaccines vehicles. *Infect Immun* 71: 2810-2818.
78. Dramsi S, Biswas I, Maguin E, Braun L, Mastroeni P, et al. (1995) Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* 16: 251-261.
79. Jia R, Guo JH, Fan MW, Bian Z, Chen Z, et al. (2004) Mucosal immunization against dental caries with plasmid DNA encoding pac gene of *Streptococcus mutans* in rats. *Vaccine* 22: 2511-2516.

80. Jakubovics N, Kerrigan S, Nobbs A, Strömberg N, Dolleweerd C, et al. (2005) Functions of cell surface anchored antigen I/II family and Hsa polypeptides in interactions of *Streptococcus gordonii* with host receptors. *Infect Immun* 73: 6629–6638.
81. Wehrl W, Niederweis M, Schumann W (2000) The FtsH protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. *J Bacteriol* 182: 3870-3873.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Steps involved in the construction of *B. subtilis* adhesive spores and expression of the vaccine antigen. (A) Generation of adhesive *B. subtilis* spores. Initially, the target genes (*slpA*, *invA* and the binding region of *invA*) were amplified using specific primers and fused to the *cotB* gene with its native promoter region. Next, the generated DNA fragment was integrated into the genome of the *B. subtilis* 1012 strain in a nonessential gene (*thrC*). The recombinant strains were selected, confirmed by DNA sequencing and named BsSlpA, BsInvA and BsInv600. (B) Generation of the *B. subtilis* vector encoding the *S. mutans* P1₃₉₋₅₁₂ antigen. The *spaP1N* (1.4 kb) fragment, which encodes an amino-terminal region encompassing the saliva-binding domain of the P1 protein, was removed from the pGP1N vector and subcloned in frame within the pHCMC03 vector under the control of the stress-inducible promoter (*PgsiB*), originating from the pLDV702 vector. The pLDV702 was introduced into the different *B. subtilis* strains, giving rise to the recombinant LDV703 (SlpA), LDV704 (InvA) and LDV705 (Inv600) strains.

Figure 2. Expression of recombinant proteins by engineered *B. subtilis* strains. (A) Expression of the adhesive recombinant proteins on the *B. subtilis* spore-coats. Spore-coat proteins of each strain were extracted, sorted by SDS-PAGE, blotted to nitrocellulose membranes and reacted with antibodies specific for SlpA for the LDV703 strain or InvA for the LDV704 and LDV705 strains. (B) Surface expression of recombinant proteins on spores of the *B. subtilis* strains. Spores were treated with antibodies specific for SlpA for the LDV703 strain or InvA for the LDV704 and LDV705 strains. Spores of the LDV702 strain reacted with neither SlpA- nor InvA-specific sera. To illustrate this result, LDV702 spores incubated with anti-SlpA antibodies are shown. Final picture amplification of 1,000x. (C) Expression of the *S. mutans* P1₃₉₋₅₁₂ antigen by *B. subtilis* vegetative cells. Cells were cultivated in LB media at 37 °C, shifted to 42 °C and kept at this temperature for 3.5 h before harvesting. The same number of cells was applied in each electrophoretic run, and the P1₃₉₋₅₁₂ expression was monitored in *Western blots* developed with P1-specific sera. (D) Quantification of P1₃₉₋₅₁₂ expression by the recombinant *B. subtilis* strains by dot-blot. The same number of

cells (determined by the optical density at O.D._{600nm}) were blotted on nitrocellulose sheets and reacted with P1-specific serum. The *B. subtilis* LDV702 strain was used as a reference. Nonspecific reactions with the anti-P1 were not detected with the *B. subtilis* 1012 strain. Known concentrations of the purified recombinant P1₃₉₋₅₁₂ protein were used to determine the concentrations of the proteins expressed by each *B. subtilis* strain. Molecular weights from proteins are indicated on the right side of the figure.

Figure 3. Functional characterization of bacterial adhesins expressed on the surface of *B. subtilis* spores. **(A)** Adhesion assays on Caco-2 cells. Spores (5×10^9 /well) were added to wells containing 2×10^5 Caco-2 cells and incubated for 2 h. The number of viable spores remaining in contact with the Caco-2 cells was determined by plating whole cell homogenates. The *B. subtilis* LDV702 strain was used as a reference. The results represent the average of three independent experiments each carried out in duplicate. Values are expressed by means \pm SD. (*) indicates statistically significant differences compared to the results obtained with the LDV702 strain ($p < 0.05$). **(B)** Persistence of *B. subtilis* spores in the gut of Balb/c mice. Spores (10^{11} spores) in bicarbonate solution were orally administered, and fecal samples were collected from animals periodically, diluted in saline, heated and plated on LB media supplemented with antibiotics ($n = 5$). *In vivo* adhesiveness assay to Peyer's patches of mice inoculated with adhesive spores of *B. subtilis*. **(C)** and **(D)** Interaction of *B. subtilis* with mouse PPs. Spores (5×10^9 spores) were given orally to BALB/c mice ($n = 4$), and on 1 **(C)** and 6 **(D)** days post administration, the mice were sacrificed and the PP were surgically removed, homogenized and plated on LB supplemented with antibiotics for the determination of viable spores and vegetative cells.

Figure 4. Detection of P1-specific serum IgG **(A)** and salivary IgA **(B)** responses in mice immunized with recombinant *B. subtilis* spores. Mice were immunized with spores of the *B. subtilis* LDV702 (non-recombinant protein on the spore surface), LDV703 (CotB-SlpA), LDV704 (CotB-InvA), and LDV705 (CotB-Inv600) strains. Animals received a vaccine regimen consisting of 9 doses with 5×10^{10} spores/dose applied in three consecutive daily doses given at intervals of 2 weeks. P1-specific antibody responses in the serum and saliva samples were measured by ELISA. Similar immunization regimens were carried out with the *B. subtilis* 1012 strain, and the results were considered background and subtracted from the results obtained with the other *B. subtilis* strains. **(C)** Inhibition of SAG-mediated adhesion and aggregation of *S. mutans* by P1-specific sera raised in mice immunized with *B. subtilis* spores. The same number of cells of the *S. mutans* NG8 strain was incubated with the tested sera at the same concentration ($2 \mu\text{g/ml}$ of P1-specific IgG). Bacterial cells were transferred to 96-well plates previously coated with SAG (100 ng/well), and after a 2 h incubation, the number of bacteria remaining attached to the wells was determined after staining

with 0.5% crystal violet and subsequently solubilizing the dye. The inhibition of the adherence was determined using the following formula: $100 - ((\text{Abs}_{600\text{nm}} \text{ NG8 cells incubated with the tested serum sample} \times 100) / \text{Abs}_{600\text{nm}} \text{ NG8 cells not incubated with mouse serum})$. For the determination of bacterial aggregation and inhibition promoted by the P1-specific sera, cells of the *S. mutans* NG8 strain were incubated with the tested sera at the same concentration of P1-specific IgG (2 $\mu\text{g/ml}$) and added to soluble SAG. The O.D._{600nm} of the samples were measured at the addition of soluble SAG (T0) and after 1 h of incubation at 37°C (T1). The final O.D. was represented by T0 – T1. The inhibition of aggregation was determined by the following formula: $100 - ((\text{final Abs}_{600\text{nm}} \text{ NG8 cells incubated with the tested serum sample} \times 100) / \text{final Abs}_{600\text{nm}} \text{ NG8 cells not incubated with mouse serum})$. The results represent the average of three independent experiments carried out in triplicate. Statistically significant difference with regard to the results obtained with the *B. subtilis* LDV702 strain (*, p <0.05; **, p < 0.01; ***, p <0.001).

Figure 5. Determination of antibody responses in mice immunized with *B. subtilis* spores via the s.l. (A) or the i.n. (C) administration routes and blockage of *S. mutans* SAG-mediated adhesion (B) and aggregation (D) by the P1-specific serum samples. Mice were immunized with 3 single doses (10^8 spores/dose) of the *B. subtilis* LDV704 or LDV702 strain. The P1-specific IgG responses were measured by ELISA with pooled serum samples. Similar immunization regimens were conducted with the *B. subtilis* 1012 strain, and the results from the samples collected on the same days were subtracted from the corresponding values from mice immunized with the vaccine strains. Inhibition of SAG-mediated adhesion and aggregation experiments were carried out as described in figure 4. Statistically significant difference with regard to the results obtained with the *B. subtilis* LDV702 strain (*, p <0.05; **, p < 0.01; ***, p <0.001).

Table 1. Strains and plasmids used in this work.

| Plasmids | Characteristics | Reference |
|---------------------------|---|-----------|
| <i>B. subtilis</i> | | |
| pDG1731 | Vector for ectopic integration at the <i>thrC</i> locus, Amp ^r , Spec ^r ; | 75 |
| pHCMC03 | <i>PgsiB</i> (stress-inducible promoter), Amp ^r ;Cm ^r ; | 76 |
| pDGcotB | pDG1731-derivative plasmid with the amino terminal region of the <i>cotB</i> gene and the CotB promoter from the <i>B. subtilis</i> 1012 strain; | This work |
| pGP1N | pGEM-T-easy vector with a cloned sequence encoding the amino terminal region of the <i>S. mutans</i> UA159 strain P1 protein (P1 ₃₉₋₅₁₂); | 15 |
| pSlpA | pDGcotB-derivative plasmid encoding the <i>L. brevis</i> SlpA binding region; | This work |
| pInvA | pDGcotB-derivative plasmid encoding the <i>Y. pseudotuberculosis</i> InvA protein; | This work |
| pInv600 | pDGcotB-derivative plasmid encoding the <i>Y. pseudotuberculosis</i> InvA receptor binding protein (InvA ₆₀₀); | This work |
| pLDV702 | pHCMC03-derivative plasmid encoding the <i>S. mutans</i> P1 ₃₉₋₅₁₂ protein; | This work |
| Strains | Characteristics | Reference |
| <i>B. subtilis</i> | | |
| 1012 | <i>leuA8 metB5 trpC2 hsrDRM1amyE::neo</i> | 81 |
| BsSlpA | 1012 expressing the <i>slpA</i> gene | This work |
| BsInvA | 1012 expressing the <i>invA</i> gene | This work |
| BsInv600 | 1012 expressing the <i>invA</i> ₆₀₀ | This work |
| LDV702 | 1012 with pLDV702 | This work |
| LDV703 | BsSlpA with pLDV702 | This work |
| LDV704 | BsInvA with pLDV702 | This work |
| LDV705 | BsInv600 with pLDV702 | This work |

Table 2. Elimination of spores and vegetative cells in mice orally dosed with spores of different *B. subtilis* strains.

| Parameters | Strain ¹ | | | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | LDV702 | LDV703 | LDV704 | LDV705 |
| Spores and cells ² | 9.5×10^4 | 1.4×10^8 | 1.4×10^8 | 1.6×10^8 |
| Cells ² | 1.0×10^4 | 4.5×10^7 | 2.5×10^7 | 6.7×10^7 |
| Spores ² | 8.5×10^4 | 9.8×10^7 | 1.2×10^8 | 9.9×10^7 |
| % of the initial inoculum ³ | 1.9×10^{-5} | 2.8×10^{-2} | 2.8×10^{-2} | 3.3×10^{-2} |
| Spore/cell ratio | 8.5 | 2.2 | 4.7 | 1.5 |
| Relative increase ⁴ | 1 | 1.1×10^3 | 1.4×10^3 | 1.1×10^3 |

¹Mice were orally dosed with 10^{11} spores. The numbers refer to the CFU counts recovered in the feces in a cage with 5 mice during the observation period (8 days);

²Numbers of spores or vegetative cells detected in the feces of mouse groups (n=5) dosed with the different *B. subtilis* strains.

³Percentage of cells and spores recovered in the feces based on the initial number of spores administered to the animals;

⁴Relative increase in the number of spores recovered from mice dosed with the different recombinant *B. subtilis* strains compared to the parental LDV702 strain. The number of viable spores and cells recovered from mice dosed with the LDV702 strain is represented as 1.

Figure 1

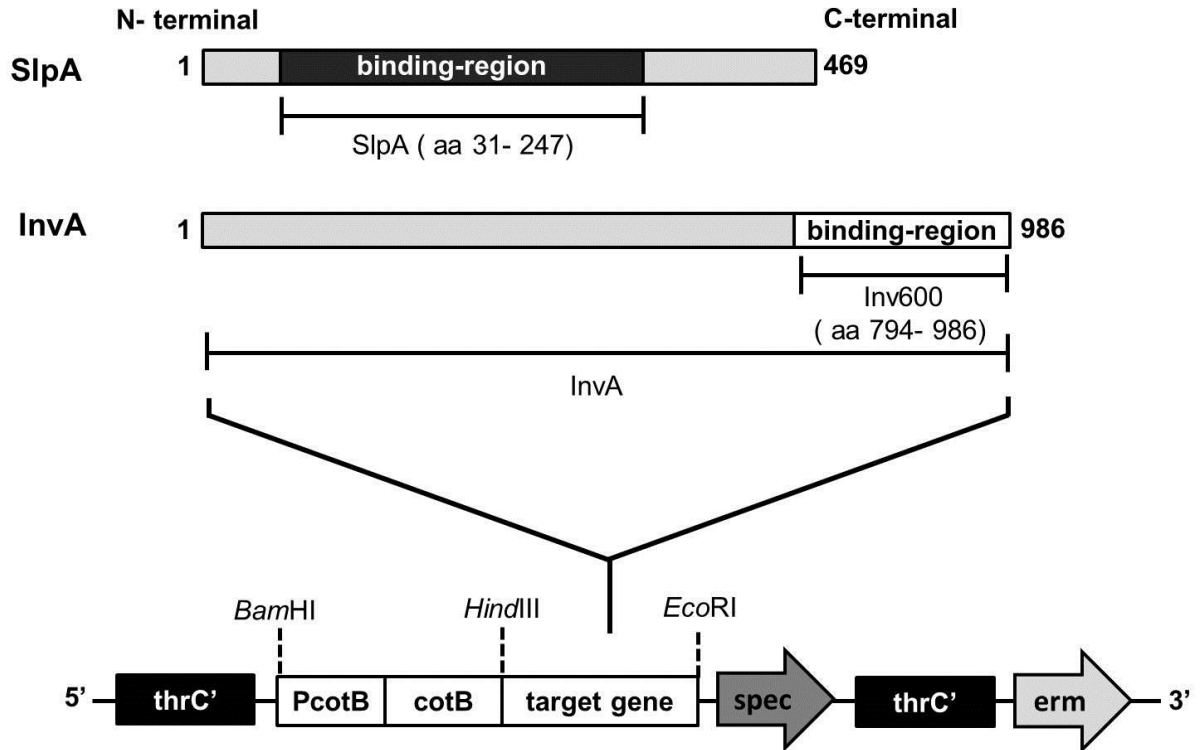
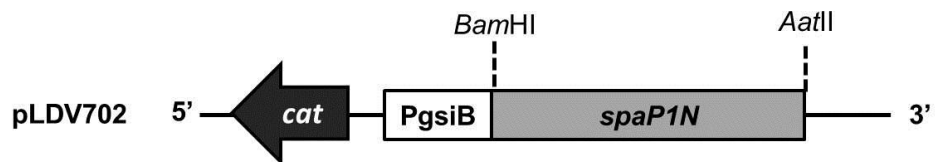
A**B**

Figure 2

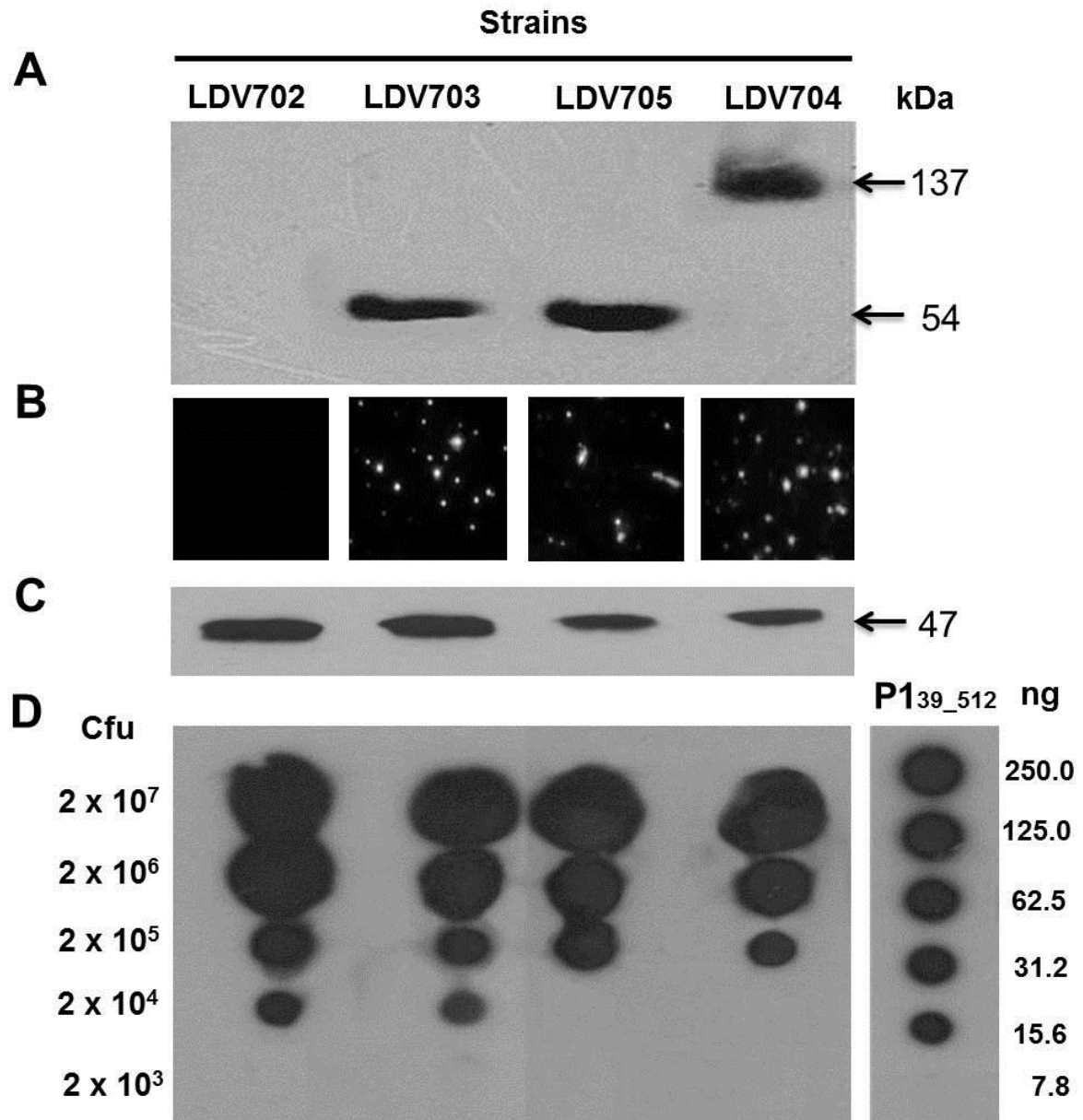


Figure 3

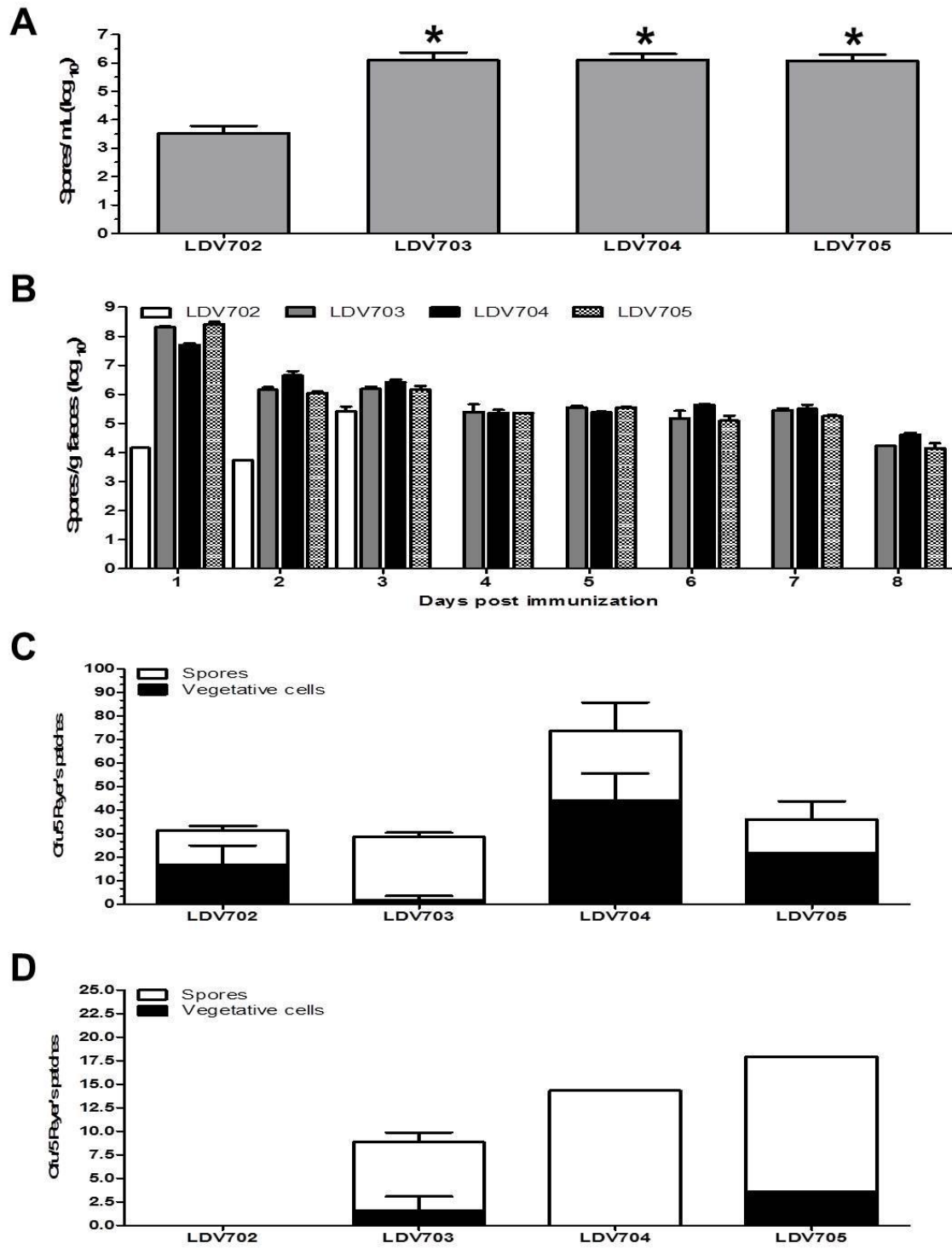


Figure 4

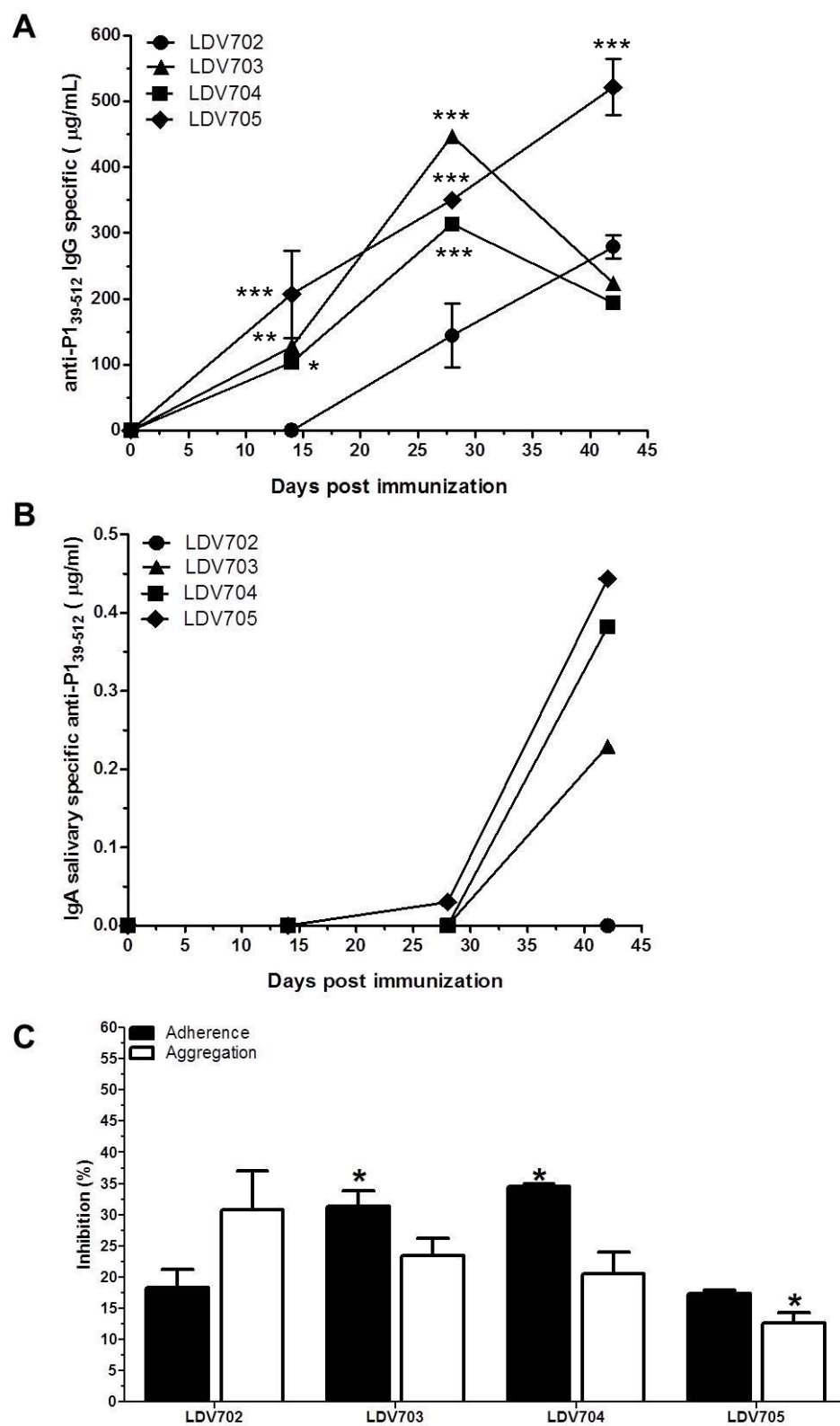
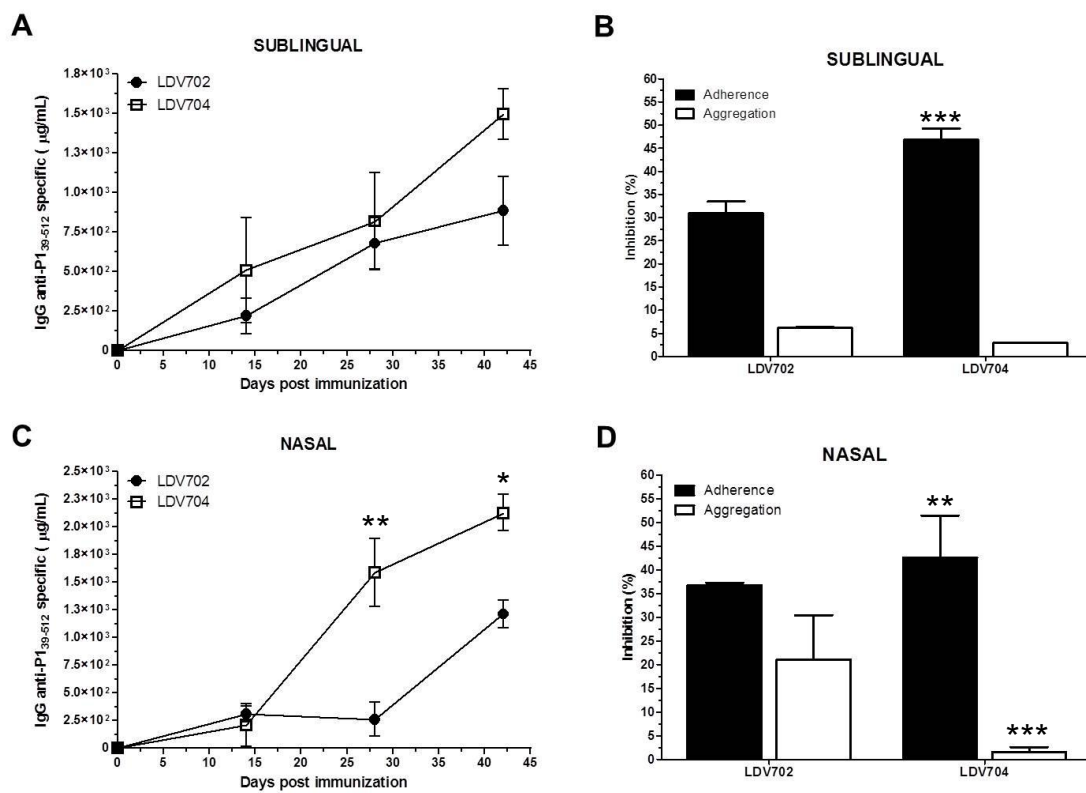


Figure 5



5 DISCUSSÃO FINAL

Na presente tese de doutorado, apresentamos a evolução de conceitos no desenvolvimento de estratégias vacinais baseadas em linhagens recombinantes de *B. subtilis* para o controle da cárie dental humana causada pelo *S. mutans*. Durante o projeto empregamos o *B. subtilis* como sistema de expressão de um novo e promissor antígeno derivado da proteína P1 de *S. mutans* para vacinas acelulares e, os esporos de *B. subtilis* como sistema de entrega direcionado para vacinas de mucosa celulares. Os resultados apresentados englobam a caracterização do antígeno vacinal, a concepção das formulações vacinais e novos sistemas de entrega de vacinas de mucosa e provas de conceito do potencial aplicado destas estratégias para o combate do patógeno oral *S. mutans*.

A proteína P1 é o maior e mais importante antígeno de superfície de *S. mutans* com papel fundamental no estágio inicial de ligação da bactéria à superfície dental por intermédio da interação com as glicoproteínas salivares, mais precisamente, com gp340 (LEITO et al., 2008). Por esse aspecto a proteína P1 é um importante alvo em estratégias vacinais contra a cárie dental humana (BRADY et al. 2010). Por sua habilidade de reconhecer os constituintes da saliva, a região A da proteína P1 é comumente referida como região de ligação à saliva (**Saliva-Binding Region** ou SBR) (NAKAI et al., 1993). Grande parte das imunizações com proteínas ou peptídeos usou essa região como alvo vacinal, e em todos os casos os polipeptídeos foram produzidos em sistema de expressão de *E. coli*. Além do problema com contaminação por endotoxinas quando a expressão é feita neste sistema, foram observados problemas como baixa recuperação do antígeno, baixa imunogenicidade e instabilidade por proteólise (CROWLEY et al., 1993; HAJISHENGALLIS; RUSSELL; MICHALEK, 1998; MUNRO et al., 1993; NAKAI et al., 1993; TAKAHASHI et al., 1991; 1992; TOIDA et al., 1997). Em nosso trabalho escolhemos um fragmento da P1 que compreende além da região SBR, a região pré-A e uma pequena porção da região V, acreditávamos que essas regiões poderiam ter influência na antigenicidade e imunogenicidade do antígeno vacinal. Essa proteína foi denominada de P1₃₉₋₅₁₂, pois engloba os resíduos de aminoácido de 39 ao 512 da proteína P1 de *S. mutans*

UA159. Além disso, decidimos usar um sistema de expressão e purificação baseado em *B. subtilis*, devido a características como ser um microrganismo gram positivo como o *S. mutans*; por seu crescente uso como sistema de expressão de proteínas heterólogas, e por fim, por todos os outros trabalhos terem usado *E. coli* e esse sistema ter se mostrado inapropriado para a expressão de fragmentos derivados da P1. Nossos resultados indicam claramente que a expressão de um antígeno derivado da P1 de *S. mutans* usando o *B. subtilis* pode ser mais vantajosa tanto em termos quantitativos, com concentrações maiores da proteína, quanto qualitativos com preservação de epítomos, características antigênicas e imunogênicas.

Ao longo dos últimos 40 anos diferentes estratégias vacinais foram estudadas para o controle da cárie dental (SHIVAKUMAR; VIDYA; GHANDU, 2009). Inicialmente, os trabalhos focaram o uso da proteína P1 ou a bactéria inteira como alvo, contudo a geração de anticorpos com reatividade cruzada com fibras cardíacas de humanos conduziu ao desenvolvimento de vacinas de subunidades contra o *S. mutans* (FERRETTI; SHEA; HUMPHREY, 1980; RUSSELL, 1987). Em sua maioria as pesquisas foram realizadas usando o antígeno SBR co-administrado ou fusionado com potentes adjuvantes como a CT do *Vibrio cholera*, ou a LT de *E. coli* assim como variações dessas proteínas, e por vias de mucosa como a intragástrica e nasal. Em geral todos os trabalhos resultaram em indução de anticorpos sistêmicos e alguns, mas não todos, a indução de IgA específico na saliva. Por outro lado, poucos evidenciaram o potencial protetor destes anticorpos em ensaios *in vitro* ou *in vivo* (HAJISHENGALLIS et al., 1995, 1996; TOIDA et al., 1997; WU; RUSSELL, 1998). Em nossas estratégias usamos um novo antígeno, a P1₃₉₋₅₁₂, co-administrado com novos adjuvantes como a LTK4R e a flagelina. Além disso, usamos a via subcutânea para imunização visto que as proteínas administradas por vias de mucosa podem sofrer proteólise. Nas estratégias desenvolvidas por nosso grupo demonstramos que a associação com os adjuvantes LTK4R ou FliCi foi importante para melhorar a qualidade da resposta com a geração de anticorpos bloqueadores da adesão de *S. mutans* à SAG, e pouco interferentes com a agregação, um mecanismo inato de proteção do hospedeiro.

Em uma estratégia inovadora nosso grupo desenvolveu um sistema de entrega de mucosa baseado em esporos de *B. subtilis* modificados para expressar diferentes adesinas bacterianas (SlpA, InvA ou Inv600) em sua superfície e após germinação expressar o antígeno alvo, visando aumentar a imunogenicidade do antígeno carregado, em particular, após administração oral. A concepção desta estratégia consistia na premissa que os esporos recombinantes teriam um maior tempo de permanência no TGI e seriam capazes de direcionar o antígeno alvo para o tecido linfóide associado à mucosa melhorando a captura e entrega para as células dendríticas, nas quais os esporos iriam germinar e expressar o antígeno vacinal P1₃₉₋₅₁₂. Os resultados *in vitro* e *in vivo* comprovaram que as adesinas bacterianas na superfície dos esporos mantiveram sua atividade biológica e aumentaram o tempo, captura e contato com células das placas de Peyer. Além disso, a imunização oral com os esporos adesivos foi capaz de potencializar a resposta imune sistêmica e de mucosa específica contra o antígeno P1₃₉₋₅₁₂. Além disso, os esporos das linhagens LDV703 (SlpA) e LDV704 (InvA) modularam qualitativamente a resposta sistêmica com a geração de soros fortemente inibidores da adesão, mas não da agregação. A diferença na qualidade da resposta encontrada entre a linhagem LDV704 e LDV705 pode refletir a menor afinidade da proteína Inv600 pelo receptor na superfície das células M e pela não internalização desses esporos, visto que a alta afinidade da invasina e a invasão promovida por ela é dependente da sua região N-terminal (DERSCH et al., 1999). O uso dos esporos adesivos da linhagem LDV704 por outras vias de administração de mucosa resultou no aumento da magnitude e da qualidade da resposta imune sistêmica comparada à imunização oral, principalmente pela via nasal. Os dados podem representar aspectos como a presença dos receptores β 1 integrinas no NALT (nasal-associated lymphoid tissue) e em células B de memórias presentes na cavidade nasal (DORNER et al., 2010). Desta forma, a estratégia vacinal desenvolvida é uma abordagem barata, segura e com amplo espectro de aplicação sobre patógenos que colonizam ou invadem o epitélio da mucosa como o caso do *S. mutans*.

Apesar da maioria das estratégias usadas nesse trabalho ter falhado na indução de uma resposta imune de mucosa potente e persistente com a presença de

IgA salivar, os resultados com a indução de anticorpos sistêmicos são encorajadores e promissores visto que a presença de IgG, extravasado no fluido crevicular, já foi correlacionado com proteção em primatas não-humanos à cárie dental (LEHNER, 1992).

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Conseguimos desenvolver e caracterizar duas estratégias vacinais voltadas para o controle do patógeno *S. mutans* usando o *B. subtilis* como ferramenta. Como sistema de expressão, o *B. subtilis* permitiu a expressão de quantidades elevadas de um novo antígeno vacinal derivado da proteína P1 com estrutura conformacional semelhante à proteína P1 nativa e com propriedades imunogênicas preservadas. Como sistema de entrega, esporos geneticamente modificados de *B. subtilis* mostraram ser uma potente estratégia de imunização por via de mucosa, permitindo o direcionamento e o aumento da imunogenicidade do antígeno vacinal. Essa é uma estratégia inovadora com excelentes perspectivas para o desenvolvimento de vacinas anti-cárie de fácil aplicação, baixo custo, com elevada estabilidade e segurança. Os resultados obtidos representam um passo importante no estudo de vacinas anti-cárie e trazem perspectivas renovadas sobre o desenvolvimento de formulações eficazes para uso em seres humanos.

REFERÊNCIAS¹

AIRAKSINEN, U.; PENTTILA, T.; WAHLSTROM, E.; VUOLA, J. M.; PUOLAKKAINEN, M.; SARVAS, M. Production of *Chlamydia pneumoniae* proteins in *Bacillus subtilis* and their use in characterizing immune responses in the experimental infection model. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 367-375, 2003.

AJDIC, D.; MCSHAN, W. M.; MCLAUGHLIN, R. E.; SAVIC, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; JIA, H.; LIN, S.; QIAN, Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B. A.; FERRETTI, J. J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, p. 14434-14439, 2002.

ALPERS, J. H.; STEWARD, M. W.; SOOTHILL, J. F. Differences in immune elimination in inbred mice. The role of low affinity antibody. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 12, p. 121-132, 1972.

ALVING, C. R.; PEACHMAN, K. K.; RAO, M.; REED, S. G. Adjuvants for human vaccines. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 24, p. 310-315, 2012.

AMUGUNI, H.; LEE, S.; KERSTEIN, K.; BROWN, D.; BELITSKY, B.; HERRMANN, J.; KEUSCH, G.; SONENSHEIN, A.; TZIPORI, S. Sublingual immunization with an engineered *Bacillus subtilis* strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. **Microbes Infect.**, v. 14, p. 447-456, 2012.

AMUGUNI, H.; TZIPORI, S. *Bacillus subtilis*: A temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. **Hum. Vaccin. Immunother.**, v. 8, p. 979-986, 2012.

AMUGUNI, J. H.; LEE, S.; KERSTEIN, K. O.; BROWN, D. W.; BELITSKY, B. R.; HERRMANN, J. E.; KEUSCH, G. T.; SONENSHEIN, A. L.; TZIPORI, S. Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. **Vaccine**, v. 29, p. 4778-4784, 2011.

ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPIZIZEN, J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 81, p. 741-746, 1961.

ARMSTRONG, M. E.; LAVELLE, E. C.; LOSCHER, C. E.; LYNCH, M. A.; MILLS, K. H. Proinflammatory responses in the murine brain after intranasal delivery of cholera toxin: implications for the use of AB toxins as adjuvants in intranasal vaccines. **J. Infect. Dis.**, v. 192, p. 1628-1633, 2005.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AVALL-JAASKELAINEN, S.; LINDHOLM, A.; PALVA, A. Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 2230-2236, 2003.

AYAKAWA, G. Y.; BOUSHELL, L. W.; CROWLEY, P. J.; ERDOS, G. W.; MCARTHUR, W. P.; BLEIWEIS, A. S. Isolation and characterization of monoclonal antibodies specific for antigen P1, a major surface protein of mutans streptococci. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 2759-2767, 1987.

BAEK, J. O.; SEO, J. W.; KWON, O.; PARK, S. M.; KIM, C. H.; KIM, I. H. Production of human papillomavirus type 33 L1 major capsid protein and virus-like particles from *Bacillus subtilis* to develop a prophylactic vaccine against cervical cancer. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 50, p. 173-180, 2012.

BARGIERI, D. Y.; ROSA, D. S.; BRAGA, C. J.; CARVALHO, B. O.; COSTA, F. T.; ESPINDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; SOARES, I. S.; FERREIRA, L. C.; RODRIGUES, M. M. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella* Typhimurium FliC flagellin. **Vaccine**, v. 26, p. 6132-6142, 2008.

BELYAKOV, I. M.; AHLERS, J. D. What role does the route of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens? **J. Immunol.**, v. 183, p. 6883-6892, 2009.

BOLTON, D. L.; SONG, K.; WILSON, R. L.; KOZLOWSKI, P. A.; TOMARAS, G. D.; KEELE, B. F.; LOVINGOOD, R. V.; RAO, S.; ROEDERER, M. Comparison of systemic and mucosal vaccination: impact on intravenous and rectal SIV challenge. **Mucosal Immunol.**, v. 5, p. 41-52, 2012.

BOWEN, W. H. Dental diseases in primates. **Proc. R. Soc. Med.**, v. 62, p. 1295-1969.

BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res.**, v. 45, p. 69-86, 2011.

BOWEN, W. H.; SCHILLING, K.; GIERTSEN, E.; PEARSON, S.; LEE, S. F.; BLEIWEIS, A.; BEEMAN, D. Role of a cell surface-associated protein in adherence and dental caries. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4606-4609, 1991.

BRADY, L. J. Antibody-mediated immunomodulation: a strategy to improve host responses against microbial antigens. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 671-678, 2005.

BRADY, L. J.; CROWLEY, P. J.; MA, J. K.; KELLY, C.; LEE, S. F.; LEHNER, T.; BLEIWEIS, A. S. Restriction fragment length polymorphisms and sequence variation within the spaP gene of *Streptococcus mutans* serotype c isolates. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 1803-1810, 1991.

BRADY, L. J.; CVITKOVITCH, D. G.; GERIC, C. M.; ADDISON, M. N.; JOYCE, J. C.; CROWLEY, P. J.; BLEIWEIS, A. S. Deletion of the central proline-rich repeat domain results in altered antigenicity and lack of surface expression of the *Streptococcus mutans* P1 adhesin molecule. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4274-4282, 1998.

BRADY, L. J.; MADDOCKS, S. E.; LARSON, M. R.; FORSGREN, N.; PERSSON, K.; DEIVANAYAGAM, C. C.; JENKINSON, H. F. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. **Mol. Microbiol.**, v. 77, p. 276-286, 2010.

BRADY, L. J.; PIACENTINI, D. A.; CROWLEY, P. J.; OYSTON, P. C.; BLEIWEIS, A. S. Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of mutans streptococci by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 1008-1017, 1992.

BRAGA, C. J.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; ALENCAR, B. C.; BARGIERI, D. Y.; BOSCARDIN, S. B.; RODRIGUES, M. M.; FERREIRA, L. C. CD8+ T cell adjuvant effects of *Salmonella* FliC_d flagellin in live vaccine vectors or as purified protein. **Vaccine**, v. 28, p. 1373-1382, 2010.

BRAGA, C. J.; RITTNER, G. M.; MUNOZ HENAO, J. E.; TEIXEIRA, A. F.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; TABORDA, C. P.; TRAVASSOS, L. R.; FERREIRA, L. C. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Samonella enterica* FliC flagellin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1700-1707, 2009.

CANO, F.; LILJEQVIST, S.; NGUYEN, T. N.; SAMUELSON, P.; BONNEFOY, J. Y.; STAHL, S.; ROBERT, A. A surface-displayed cholera toxin B peptide improves antibody responses using food-grade staphylococci for mucosal subunit vaccine delivery. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 25, p. 289-298, 1999.

CAUFIELD, P. W.; CUTTER, G. R.; DASANAYAKE, A. P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. **J. Dent. Res.**, v. 72, p. 37-45, 1993.

CERAGIOLI, M.; CANGIANO, G.; ESIN, S.; GHELARDI, E.; RICCA, E.; SENESI, S. Phagocytosis, germination and killing of *Bacillus subtilis* spores presenting heterologous antigens in human macrophages. **Microbiology**, v. 155, p. 338-346, 2009.

CLARK, M. A.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1237-1243, 1998.

CONNELL, T. D. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by type I and type II heat-labile enterotoxins. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 6, p. 821-834, 2007.

COTE, S.; GELTMAN, P.; NUNN, M.; LITURI, K.; HENSHAW, M.; GARCIA, R. I. Dental caries of refugee children compared with US children. **Pediatrics**, v. 114, p. e733-e740, 2004.

CRITCHLEY, R. J.; JEZZARD, S.; RADFORD, K. J.; GOUSSARD, S.; LEMOINE, N. R.; GRILLOT-COURVALIN, C.; VASSAUX, G. Potential therapeutic applications of recombinant, invasive *E. coli*. **Gene Ther.**, v. 11, p. 1224-1233, 2004.

CRITCHLEY-THORNE, R. J.; STAGG, A. J.; VASSAUX, G. Recombinant *Escherichia coli* expressing invasin targets the Peyer's patches: the basis for a bacterial formulation for oral vaccination. **Mol. Ther.**, v. 14, p. 183-191, 2006.

CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; MICHALEK, S. M.; BLEIWEIS, A. S. Virulence of a spaP mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 1201-1206, 1999.

CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; PIACENTINI, D. A.; BLEIWEIS, A. S. Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 1547-1552, 1993.

CUTTING, S. M.; HONG, H. A.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E. Oral vaccine delivery by recombinant spore probiotics. **Int. Rev. Immunol.**, v. 28, p. 487-505, 2009.

D'ARIENZO, R.; MAURANO, F.; MAZZARELLA, G.; LUONGO, D.; STEFANILE, R.; RICCA, E.; ROSSI, M. *Bacillus subtilis* spores reduce susceptibility to *Citrobacter rodentium*-mediated enteropathy in a mouse model. **Res. Microbiol.**, v. 157, p. 891-897, 2006.

DARJI, A.; ZUR, L. S.; GARBE, A. I.; CHAKRABORTY, T.; WEISS, S. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella* Typhimurium as carrier. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 27, p. 341-349, 2000.

DARRIEUX, M.; MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, L. M.; LOPES, A. P.; REN, B.; BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; LEITE, L. C. Fusion proteins containing family 1 and family 2 PspA fragments elicit protection against *Streptococcus pneumoniae* that correlates with antibody-mediated enhancement of complement deposition. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 5930-5938, 2007.

DEMUTH, D. R.; DAVIS, C. A.; CORNER, A. M.; LAMONT, R. J.; LEBOY, P. S.; MALAMUD, D. Cloning and expression of a *Streptococcus sanguis* surface antigen that interacts with a human salivary agglutinin. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 2484-2490, 1988.

DEMUTH, D. R.; GOLUB, E. E.; MALAMUD, D. Streptococcal-host interactions. Structural and functional analysis of a *Streptococcus sanguis* receptor for a human salivary glycoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 7120-7126, 1990.

DERSCH, P.; ISBERG, R. R. A region of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. **EMBO J.**, v. 18, p. 1199-1213, 1999.

DEWHIRST, F. E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B. J.; TANNER, A. C.; YU, W. H.; LAKSHMANAN, A.; WADE, W. G. The human oral microbiome. **J. Bacteriol.**, v. 192, p. 5002-5017, 2010.

DORNER, M.; ZUCOL, F.; ALESSI, D.; HAERLE, S. K.; BOSSART, W.; WEBER, M.; BYLAND, R.; BERNASCONI, M.; BERGER, C.; TUGIZOV, S.; SPECK, R. F.; NADAL, D. beta1 integrin expression increases susceptibility of memory B cells to Epstein-Barr virus infection. **J. Virol.**, v. 84, p. 6667-6677, 2010.

DRAMSI, S.; KOCKS, C.; FORESTIER, C.; COSSART, P. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator prfA. **Mol. Microbiol.**, v. 9, p. 931-941, 1993.

DUC, I. H.; HONG, H. A.; ATKINS, H. S.; FLICK-SMITH, H. C.; DURRANI, Z.; RIJPKEMA, S.; TITBALL, R. W.; CUTTING, S. M. Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen. **Vaccine**, v. 25, p. 346-355, 2007.

DUC, I. H.; HONG, H. A.; CUTTING, S. M. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. **Vaccine.**, v. 21, p. 4215-4224, 2003.

DUC, I. H.; HONG, H. A.; FAIRWEATHER, N.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2810-2818, 2003.

DUC, I. H.; HONG, H. A.; UYEN, N. Q.; CUTTING, S. M. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. **Vaccine**, v. 22, p. 1873-1885, 2004.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Res.**, v. 38, p. 182-191, 2004.

FERREIRA, L. C.; FERREIRA, R. C.; SCHUMANN, W. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, p. 113-124, 2005.

FERRETTI, J. J.; SHEA, C.; HUMPHREY, M. W. Cross-reactivity of *Streptococcus mutans* antigens and human heart tissue. **Infect. Immun.**, v. 30, p. 69-73, 1980.

FISCHETTI, V. A.; PANCHOLI, V.; SCHNEEWIND, O. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. **Mol. Microbiol.**, v. 4, p. 1603-1605, 1990.

FOERSTER, H. F.; FOSTER, J. W. Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. **J. Bacteriol.**, v. 91, p. 1333-1345, 1966.

FOGED, C. Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. **Ther. Deliv.**, v. 2, p. 1057-1077, 2011.

FOLIGNE, B.; PEYS, E.; VANDENKERCKHOVE, J.; VAN, H. J.; DEWULF, J.; BRETON, J.; POT, B. Spores from two distinct colony types of the strain *Bacillus subtilis* PB6 substantiate anti-inflammatory probiotic effects in mice. **Clin. Nutr.**, 2012. (prelo)

FREYTAG, L. C.; CLEMENTS, J. D. Mucosal adjuvants. **Vaccine**, v. 23, p. 1804-1813, 2005.

FU, L. L.; LI, W. F.; DU, H. H.; DAI, W.; XU, Z. R. Oral vaccination with envelope protein VP28 against white spot syndrome virus in *Procambarus clarkii* using *Bacillus subtilis* as delivery vehicles. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 46, p. 581-586, 2008.

GREEN, D. H.; WAKELEY, P. R.; PAGE, A.; BARNES, A.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Characterization of two *Bacillus* probiotics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4288-4291, 1999.

GRILLOT-COURVALIN, C.; GOUSSARD, S.; HUETZ, F.; OJCIUS, D. M.; COURVALIN, P. Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 16, p. 862-866, 1998.

GUEROUT-FLEURY, A. M.; FRANDBSEN, N.; STRAGIER, P. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. **Gene**, v. 180, p. 57-61, 1996.

GUIMARAES, V. D.; GABRIEL, J. E.; LEFEVRE, F.; CABANES, D.; GRUSS, A.; COSSART, P.; AZEVEDO, V.; LANGELLA, P. Internalin-expressing *Lactococcus lactis* is able to invade small intestine of guinea pigs and deliver DNA into mammalian epithelial cells. **Microbes Infect.**, v. 7, p. 836-844, 2005.

GUIMARAES, V. D.; INNOCENTIN, S.; LEFEVRE, F.; AZEVEDO, V.; WAL, J. M.; LANGELLA, P.; CHATEL, J. M. Use of native lactococci as vehicles for delivery of DNA into mammalian epithelial cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 7091-7097, 2006.

GUO, X.; LI, D.; LU, W.; PIAO, X.; CHEN, X. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the *in vivo* effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. **Antonie Van Leeuwenhoek.**, v. 90, p. 139-146, 2006.

GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, p. 1263-1276, 1995.

HAJISHENGALLIS, G.; ARCE, S.; GOCKEL, C. M.; CONNELL, T. D.; RUSSELL, M. W. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: applications for oral infections. **J. Dent. Res.**, v. 84, p. 1104-1116, 2005.

HAJISHENGALLIS, G.; HAROKOPAKIS, E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; RUSSELL, M. W.; MICHALEK, S. M. Construction and oral immunogenicity of a *Salmonella* typhimurium strain expressing a streptococcal adhesin linked to the A2/B subunits of cholera toxin. **Vaccine**, v. 14, p. 1545-1548, 1996.

HAJISHENGALLIS, G.; HOLLINGSHEAD, S. K.; KOGA, T.; RUSSELL, M. W. Mucosal immunization with a bacterial protein antigen genetically coupled to cholera toxin A2/B subunits. **J. Immunol.**, v. 154, p. 4322-4332, 1995.

HAJISHENGALLIS, G.; KOGA, T.; RUSSELL, M. W. Affinity and specificity of the interactions between *Streptococcus mutans* antigen I/II and salivary components. **J. Dent. Res.**, v. 73, p. 1493-1502, 1994.

HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 14, p. 1-20, 1999.

HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M.; RUSSELL, M. W. Persistence of serum and salivary antibody responses after oral immunization with a bacterial protein antigen genetically linked to the A2/B subunits of cholera toxin. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 665-667, 1996.

HAJISHENGALLIS, G.; RUSSELL, M. W.; MICHALEK, S. M. Comparison of an adherence domain and a structural region of *Streptococcus mutans* antigen I/II in protective immunity against dental caries in rats after intranasal immunization. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1740-1743, 1998.

HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **J. Dent. Res.**, v. 63, p. 407-411, 1984.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.**, v. 44, p. 331-384, 1980.

HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends Biotechnol.**, v. 10, p. 247-256, 1992.

HAYASHI, F.; SMITH, K. D.; OZINSKY, A.; HAWN, T. R.; YI, E. C.; GOODLETT, D. R.; ENG, J. K.; AKIRA, S.; UNDERHILL, D. M.; ADEREM, A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. **Nature**, v. 410, p. 1099-1103, 2001.

HIMANEN, J. P.; TAIRA, S.; SARVAS, M.; SARIS, P.; RONEBERG-NYMAN, K. Expression of pertussis toxin subunit S4 as an intracytoplasmic protein in *Bacillus subtilis*. **Vaccine**, v. 8, p. 600-604, 1990.

HOA, T. T.; DUC, L. H.; ISTICATO, R.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; VAN, P. H.; CUTTING, S. M. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 3819-3823, 2001.

HOANG, T. H.; HONG, H. A.; CLARK, G. C.; TITBALL, R. W.; CUTTING, S. M. Recombinant *Bacillus subtilis* expressing the *Clostridium perfringens* alpha toxoid is a candidate orally delivered vaccine against necrotic enteritis. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 5257-5265, 2008.

HOLMGREN, J.; ADAMSSON, J.; ANJUERE, F.; CLEMENS, J.; CZERKINSKY, C.; ERIKSSON, K.; FLACH, C. F.; GEORGE-CHANDY, A.; HARANDI, A. M.; LEBENS, M.; LEHNER, T.; LINDBLAD, M.; NYGREN, E.; RAGHAVAN, S.; SANCHEZ, J.; STANFORD, M.; SUN, J. B.; SVENNERHOLM, A. M.; TENGVALL, S. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. **Immunol. Lett.**, v. 97, p. 181-188, 2005.

HOMONYLO-MCGAVIN, M. K.; LEE, S. F. Role of the C terminus in antigen P1 surface localization in *Streptococcus mutans* and two related cocci. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 801-807, 1996.

HONKO, A. N.; SRIRANGANATHAN, N.; LEES, C. J.; MIZEL, S. B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 1113-1120, 2006.

HU, B.; LI, C.; LU, H.; ZHU, Z.; DU, S.; YE, M.; TAN, L.; REN, D.; HAN, J.; KAN, S.; WANG, J.; JIN, N. Immune responses to the oral administration of recombinant *Bacillus subtilis* expressing multi-epitopes of foot-and-mouth disease virus and a cholera toxin B subunit. **J. Virol. Methods.**, v. 171, p. 272-279, 2011.

HUANG, Y.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M. Construction and characterization of a *Samonella enterica* serovar typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus mutans* under control of the anaerobically inducible nirB promoter. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 1549-1556, 2000.

HUANG, Y.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M. Induction of protective immunity against *Streptococcus mutans* colonization after mucosal immunization with attenuated *Samonella enterica* serovar typhimurium expressing an *S. mutans* adhesin under the control of *in vivo*-inducible nirB promoter. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 2154-2161, 2001.

HYNONEN, U.; WESTERLUND-WIKSTROM, B.; PALVA, A.; KORHONEN, T. K. Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 3360-3367, 2002.

IDANPAAN-HEIKKILA, I.; WAHLSTROM, E.; MUTTILAINEN, S.; NURMINEN, M.; KAYHTY, H.; SARVAS, M.; MAKELA, P. H. Immunization with meningococcal class 1

outer membrane protein produced in *Bacillus subtilis* and reconstituted in the presence of Zwittergent or Triton X-100. **Vaccine**, v. 14, p. 886-891, 1996.

INNOCENTIN, S.; GUIMARAES, V.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; LANGELLA, P.; CHATEL, J. M.; LEFEVRE, F. *Lactococcus lactis* expressing either *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A or *Listeria monocytogenes* internalin A can efficiently internalize and deliver DNA in human epithelial cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 4870-4878, 2009.

ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; TRAN, H. T.; CIABATTINI, A.; MEDAGLINI, D.; OGGIONI, M. R.; DE, F. M.; POZZI, G.; RICCA, E. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 6294-6301, 2001.

IVINS, B. E.; EZZELL, J. W., Jr.; JEMSKI, J.; HEDLUND, K. W.; RISTROPH, J. D.; LEPPLA, S. H. Immunization studies with attenuated strains of *Bacillus anthracis*. **Infect. Immun.**, v. 52, p. 454-458, 1986.

IVINS, B. E.; WELKOS, S. L.; KNUDSON, G. B.; LITTLE, S. F. Immunization against anthrax with aromatic compound-dependent (Aro-) mutants of *Bacillus anthracis* and with recombinant strains of *Bacillus subtilis* that produce anthrax protective antigen. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 303-308, 1990.

JAKUBOVICS, N. S.; KERRIGAN, S. W.; NOBBS, A. H.; STROMBERG, N.; VAN DOLLEWEERD, C. J.; COX, D. M.; KELLY, C. G.; JENKINSON, H. F. Functions of cell surface-anchored antigen I/II family and Hsa polypeptides in interactions of *Streptococcus gordonii* with host receptors. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 6629-6638, 2005.

JENKINSON, H. F.; DEMUTH, D. R. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. **Mol. Microbiol.**, v. 23, p. 183-190, 1997.

JENKINSON, H. F.; LAMONT, R. J. Streptococcal adhesion and colonization. **Crit Rev. Oral Biol. Med.**, v. 8, p. 175-200, 1997.

JENKINSON, H. F.; TERRY, S. D.; MCNAB, R.; TANNOCK, G. W. Inactivation of the gene encoding surface protein SspA in *Streptococcus gordonii* DL1 affects cell interactions with human salivary agglutinin and oral actinomyces. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3199-3208, 1993.

KAKESHITA, H.; KAGEYAMA, Y.; ENDO, K.; TOHATA, M.; ARA, K.; OZAKI, K.; NAKAMURA, K. Secretion of biologically-active human interferon-beta by *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Lett.**, v. 33, p. 1847-1852, 2011.

KELLY, C. G.; TODRYK, S.; KENDAL, H. L.; MUNRO, G. H.; LEHNER, T. T-cell, adhesion, and B-cell epitopes of the cell surface *Streptococcus mutans* protein antigen I/II. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 3649-3658, 1995.

KELLY, C.; EVANS, P.; BERGMEIER, L.; LEE, S. F.; PROGULSKE-FOX, A.; HARRIS, A. C.; AITKEN, A.; BLEIWEIS, A. S.; LEHNER, T. Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II. **FEBS Lett.**, v. 258, p. 127-132, 1989.

KELLY, C.; EVANS, P.; MA, J. K.; BERGMEIER, L. A.; TAYLOR, W.; BRADY, L. J.; LEE, S. F.; BLEIWEIS, A. S.; LEHNER, T. Sequencing and characterization of the 185 kDa cell surface antigen of *Streptococcus mutans*. **Arch. Oral Biol.**, v. 35, p. 33S-38S, 1990. Suppl.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 290, p. 27-35, 2000.

KOGA, T.; OHO, T.; SHIMAZAKI, Y.; NAKANO, Y. Immunization against dental caries. **Vaccine**, v. 20, p. 2027-2044, 2002.

KOGA, T.; OKAHASHI, N.; TAKAHASHI, I.; KANAMOTO, T.; ASAKAWA, H.; IWAKI, M. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 289-296, 1990.

KOGA, T.; YAMASHITA, Y.; NAKANO, Y.; KAWASAKI, M.; OHO, T.; YU, H.; NAKAI, M.; OKAHASHI, N. Surface proteins of *Streptococcus mutans*. **Dev. Biol. Stand.**, v. 85, p. 363-369, 1995.

KURAMITSU, H. K. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Crit Rev. Oral Biol. Med.**, v. 4, p. 159-176, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARSON, M. R.; RAJASHANKAR, K. R.; CROWLEY, P. J.; KELLY, C.; MITCHELL, T. J.; BRADY, L. J.; DEIVANAYAGAM, C. Crystal structure of the C-terminal region of *Streptococcus mutans* antigen I/II and characterization of salivary agglutinin adherence domains. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 21657-21666, 2011.

LARSON, M. R.; RAJASHANKAR, K. R.; PATEL, M. H.; ROBINETTE, R. A.; CROWLEY, P. J.; MICHALEK, S.; BRADY, L. J.; DEIVANAYAGAM, C. Elongated fibrillar structure of a streptococcal adhesin assembled by the high-affinity association of alpha- and PPII-helices. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 107, p. 5983-5988, 2010.

LEE, S. F.; PROGULSKE-FOX, A.; BLEIWEIS, A. S. Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen, P1 (I/II), in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 2114-2119, 1988.

LEE, S. F.; PROGULSKE-FOX, A.; ERDOS, G. W.; PIACENTINI, D. A.; AYAKAWA, G. Y.; CROWLEY, P. J.; BLEIWEIS, A. S. Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3306-3313, 1989.

LEE, S.; BELITSKY, B. R.; BRINKER, J. P.; KERSTEIN, K. O.; BROWN, D. W.; CLEMENTS, J. D.; KEUSCH, G. T.; TZIPORI, S.; SONENSHEIN, A. L.; HERRMANN, J. E. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, p. 1647-1655, 2010a.

LEE, S.; BELITSKY, B. R.; BROWN, D. W.; BRINKER, J. P.; KERSTEIN, K. O.; HERRMANN, J. E.; KEUSCH, G. T.; SONENSHEIN, A. L.; TZIPORI, S. Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. **Vaccine**, v. 28, p. 6658-6665, 2010b.

LEHNER, T. **Immunology of oral diseases**. 3rd ed. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1992.

LEHNER, T.; CHALLACOMBE, S. J.; CALDWELL, J. Oral immunization with *Streptococcus mutans* in rhesus monkeys and the development of immune response and dental caries. **Immunology**, v. 41, p. 857-864, 1980.

LEHNER, T.; RUSSELL, M. W.; CALDWELL, J.; SMITH, R. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. **Infect. Immun.**, v. 34, p. 407-415, 1981.

LEHNER, T.; WALKER, P.; SMERDON, R.; CHILDERSTONE, A.; BERGMEIER, L. A.; HARON, J. Identification of T- and B-cell epitopes in synthetic peptides derived from a *Streptococcus mutans* protein and characterization of their antigenicity and immunogenicity. **Arch. Oral Biol.**, v. 35, p. 39S-45S, 1990. Suppl.

LEITO, J. T.; LIGTENBERG, A. J.; NAZMI, K.; DE BLIECK-HOGERVORST, J. M.; VEERMAN, E. C.; NIEUW AMERONGEN, A. V. A common binding motif for various bacteria of the bacteria-binding peptide SRCRP2 of DMBT1/gp-340/salivary agglutinin. **Biol. Chem.**, v. 389, p. 1193-1200, 2008.

LEONG, J. M.; FOURNIER, R. S.; ISBERG, R. R. Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein. **EMBO J.**, v. 9, p. 1979-1989, 1990.

LePORE, K. T. **Improved mucosal targeting of plant-derived vaccine antigens by fusion to a bacterial invasin protein**. 2008. 117 p. Ph. D Thesis (Microbiology) - University of Arizona, Arizona, 2008.

LI, Y. H.; LAU, P. C.; LEE, J. H.; ELLEN, R. P.; CVITKOVITCH, D. G. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 897-908, 2001.

LIGTENBERG, A. J.; VEERMAN, E. C.; NIEUW AMERONGEN, A. V.; MOLLENHAUER, J. Salivary agglutinin/glycoprotein-340/DMBT1: a single molecule with variable composition and with different functions in infection, inflammation and cancer. **Biol. Chem.**, v. 388, p. 1275-1289, 2007.

LILJEQVIST, S.; CANO, F.; NGUYEN, T. N.; UHLEN, M.; ROBERT, A.; STAHL, S. Surface display of functional fibronectin-binding domains on *Staphylococcus carnosus*. **FEBS Lett.**, v. 446, p. 299-304, 1999.

LIN, D.; QU, L. J.; GU, H.; CHEN, Z. A 3.1-kb genomic fragment of *Bacillus subtilis* encodes the protein inhibiting growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 91, p. 1044-1050, 2001.

LOEFFLER, D. I.; SCHOEN, C. U.; GOEBEL, W.; PILGRIM, S. Comparison of different live vaccine strategies *in vivo* for delivery of protein antigen or antigen-encoding DNA and mRNA by virulence-attenuated *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 3946-3957, 2006.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, v. 50, p. 353-380, 1986.

LOIMARANTA, V.; JAKUBOVICS, N. S.; HYTONEN, J.; FINNE, J.; JENKINSON, H. F.; STROMBERG, N. Fluid- or surface-phase human salivary scavenger protein gp340 exposes different bacterial recognition properties. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2245-2252, 2005.

LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C.; PACCEZ, J. D.; SOUZA, R. D.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, R. C.; FERREIRA, L. C. Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. **Vaccine**, v. 26, p. 3998-4005, 2008.

MA, J. K.; HIKMAT, B. Y.; WYCOFF, K.; VINE, N. D.; CHARGELEGUE, D.; YU, L.; HEIN, M. B.; LEHNER, T. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. **Nat. Med.**, v. 4, p. 601-606, 1998.

MA, J. K.; HUNJAN, M.; SMITH, R.; KELLY, C.; LEHNER, T. An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 3407-3414, 1990.

MA, J. K.; KELLY, C. G.; MUNRO, G.; WHILEY, R. A.; LEHNER, T. Conservation of the gene encoding streptococcal antigen I/II in oral streptococci. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 2686-2694, 1991.

MA, J. K.; LEHNER, T. Prevention of colonization of *Streptococcus mutans* by topical application of monoclonal antibodies in human subjects. **Arch. Oral Biol.**, v. 35, p. 115S-122S, 1990. Suppl.

MA, J. K.; LEHNER, T.; STABILA, P.; FUX, C. I.; HIATT, A. Assembly of monoclonal antibodies with IgG1 and IgA heavy chain domains in transgenic tobacco plants. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p. 131-138, 1994.

MA, J. K.; SMITH, R.; LEHNER, T. Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 1274-1278, 1987.

MADDOCKS, S. E.; WRIGHT, C. J.; NOBBS, A. H.; BRITTAN, J. L.; FRANKLIN, L.; STROMBERG, N.; KADIOGLU, A.; JEPSON, M. A.; JENKINSON, H. F. *Streptococcus pyogenes* antigen I/II-family polypeptide AspA shows differential ligand-binding properties and mediates biofilm formation. **Mol. Microbiol.**, v. 81, p. 1034-1049, 2011.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Comparison of the indigenous oral microbiota and immunoglobulin responses of athymic (nu/nu) and euthymic (nu/+) mice. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 12, p. 141-147, 1997.

MARTIN, M.; METZGER, D. J.; MICHALEK, S. M.; CONNELL, T. D.; RUSSELL, M. W. Comparative analysis of the mucosal adjuvant activity of the type II heat-labile enterotoxins LT-IIa and LT-IIb. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 281-287, 2000.

MATSUMOTO-NAKANO, M.; TSUJI, M.; AMANO, A.; OOSHIMA, T. Molecular interactions of alanine-rich and proline-rich regions of cell surface protein antigen c in *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 23, p. 265-270, 2008.

MATSUSHITA, K.; NISIZAWA, T.; NAGAOKA, S.; KAWAGOE, M.; KOGA, T. Identification of antigenic epitopes in a surface protein antigen of *Streptococcus mutans* in humans. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4034-4042, 1994.

MAURIELLO, E. M.; DUC, I. H.; ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; HONG, H. A.; DE, F. M.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. **Vaccine**, v. 22, p. 1177-1187, 2004.

MBOW, M. L.; DE, G. E.; ULMER, J. B. Alum's adjuvant action: grease is the word. **Nat. Med.**, v. 17, p. 415-416, 2011.

MCARTHUR, W. P.; RHODIN, N. R.; SEIFERT, T. B.; OLI, M. W.; ROBINETTE, R. A.; DEMUTH, D. R.; BRADY, L. J. Characterization of epitopes recognized by anti-*Streptococcus mutans* P1 monoclonal antibodies. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 342-353, 2007.

MEIMA, R.; VAN DIJL, J. M.; BRON, S. Expression systems in *Bacillus*. In: Baneyx, François. **Protein Expression Technologies**. 1st ed. Norfolk: Horizon Bioscience, 2004. p. 199-252.

MESTECKY, J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. **J. Clin. Immunol.**, v. 7, p. 265-276, 1987.

MICHALEK, S. M.; CHILDERS, N. K. Development and outlook for a caries vaccine. **Crit Rev. Oral Biol. Med.**, v. 1, p. 37-54, 1990.

MICHALEK, S. M.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H.; OCHIAI, K.; MCGHEE, J. R. Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. **Infect. Immun.**, v. 33, p. 690-696, 1981.

MICHALEK, S. M.; KATZ, J.; CHILDERS, N. K. A vaccine against dental caries: an overview. **BioDrugs**, v. 15, p. 501-508, 2001.

MOISSET, A.; SCHATZ, N.; LEPOIVRE, Y.; AMADIO, S.; WACHSMANN, D.; SCHOLLER, M.; KLEIN, J. P. Conservation of salivary glycoprotein-interacting and human immunoglobulin G-cross-reactive domains of antigen I/II in oral streptococci. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 184-193, 1994.

MUNRO, G. H.; EVANS, P.; TODRYK, S.; BUCKETT, P.; KELLY, C. G.; LEHNER, T. A protein fragment of streptococcal cell surface antigen I/II which prevents adhesion of *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4590-4598, 1993.

MURAKAMI, Y.; YAMASHITA, Y.; NAKANO, Y.; ITO, H. O.; YU, H.; KOGA, T. Role of the charged tail in localization of a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 1531-1535, 1997.

MUTTILAINEN, S.; IDANPAAN-HEIKKILA, I.; WAHLSTROM, E.; NURMINEN, M.; MAKELA, P. H.; SARVAS, M. The *Neisseria meningitidis* outer membrane protein P1 produced in *Bacillus subtilis* and reconstituted into phospholipid vesicles elicits antibodies to native P1 epitopes. **Microb. Pathog.**, v. 18, p. 423-436, 1995.

NAKAI, M.; OKAHASHI, N.; OHTA, H.; KOGA, T. Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 4344-4349, 1993.

NAVARRE, W. W.; SCHNEEWIND, O. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 174-229, 1999.

NEUTRA, M. R.; KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 148-158, 2006.

NGUYEN, H. D.; NGUYEN, Q. A.; FERREIRA, R. C.; FERREIRA, L. C.; TRAN, L. T.; SCHUMANN, W. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. **Plasmid**, v. 54, p. 241-248, 2005.

NGUYEN, H. D.; PHAN, T. T.; SCHUMANN, W. Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Curr. Microbiol.**, v. 55, p. 89-93, 2007.

NING, D.; LENG, X.; LI, Q.; XU, W. Surface-displayed VP28 on *Bacillus subtilis* spores induce protection against white spot syndrome virus in crayfish by oral administration. **J. Appl. Microbiol.**, v. 111, p. 1327-1336, 2011.

OGIER, J. A.; SCHOLLER, M.; LEPROIVRE, Y.; PINI, A.; SOMMER, P.; KLEIN, J. P. Complete nucleotide sequence of the sr gene from *Streptococcus mutans* OMZ 175. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 56, p. 223-227, 1990.

OHO, T.; YU, H.; YAMASHITA, Y.; KOGA, T. Binding of salivary glycoprotein-secretory immunoglobulin A complex to the surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 115-121, 1998.

OKAHASHI, N.; SASAKAWA, C.; YOSHIKAWA, M.; HAMADA, S.; KOGA, T. Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries. **Mol. Microbiol.**, v. 3, p. 673-678, 1989.

OKAHASHI, N.; TAKAHASHI, I.; NAKAI, M.; SENPUKU, H.; NISIZAWA, T.; KOGA, T. Identification of antigenic epitopes in an alanine-rich repeating region of a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 1301-1306, 1993.

OLI, M. W.; MCARTHUR, W. P.; BRADY, L. J. A whole cell BIAcore assay to evaluate P1-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to human salivary agglutinin and inhibition by specific antibodies. **J. Microbiol. Methods**, v. 65, p. 503-511, 2006.

OYSTON, P.; ROBINSON, K. The current challenges for vaccine development. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 889-894, 2012.

OZDAMAR, T. H.; SENTURK, B.; YILMAZ, O. D.; CALIK, G.; CELIK, E.; CALIK, P. Expression system for recombinant human growth hormone production from *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Prog.**, v. 25, p. 75-84, 2009.

PACCEZ, J. D.; LUIZ, W. B.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, R. C.; SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. **Vaccine.**, v. 24, p. 2935-2943, 2006.

PACCEZ, J. D.; NGUYEN, H. D.; LUIZ, W. B.; FERREIRA, R. C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; SCHUMAN, W.; FERREIRA, L. C. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. **Vaccine**, v. 25, p. 4671-4680, 2007.

PAULITZ, T. C.; BELANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 39, p. 103-133, 2001.

PERMPOONPATTANA, P.; HONG, H. A.; KHANEJA, R.; CUTTING, S. M. Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. **Benef. Microbes**, v. 3, p. 127-135, 2012.

PERMPOONPATTANA, P.; HONG, H. A.; PHETCHARABURANIN, J.; HUANG, J. M.; COOK, J.; FAIRWEATHER, N. F.; CUTTING, S. M. Immunization with *Bacillus* spores

expressing toxin A peptide repeats protects against infection with *Clostridium difficile* strains producing toxins A and B. **Infect. Immun.**, v. 79, p. 2295-2302, 2011.

PHAN, T. T.; NGUYEN, H. D.; SCHUMANN, W. Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Protein Expr. Purif.**, v. 46, p. 189-195, 2006.

POHL, S.; HARWOOD, C. R. Heterologous protein secretion by *Bacillus* species from the cradle to the grave. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 73, p. 1-25, 2010.

POTOT, S.; SERRA, C. R.; HENRIQUES, A. O.; SCHYNS, G. Display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores, using a coat-associated enzyme as the carrier. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 5926-5933, 2010.

PRAKOBPHOL, A.; XU, F.; HOANG, V. M.; LARSSON, T.; BERGSTROM, J.; JOHANSSON, I.; FRANGSMYR, L.; HOLMSKOV, U.; LEFFLER, H.; NILSSON, C.; BOREN, T.; WRIGHT, J. R.; STROMBERG, N.; FISHER, S. J. Salivary agglutinin, which binds *Streptococcus mutans* and Helicobacter pylori, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 39860-39866, 2000.

RHODIN, N. R.; VAN TILBURG, M. L.; OLI, M. W.; MCARTHUR, W. P.; BRADY, L. J. Further characterization of immunomodulation by a monoclonal antibody against *Streptococcus mutans* antigen P1. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 13-21, 2004.

ROBINETTE, R. A.; OLI, M. W.; MCARTHUR, W. P.; BRADY, L. J. A therapeutic anti-*Streptococcus mutans* monoclonal antibody used in human passive protection trials influences the adaptive immune response. **Vaccine**, v. 29, p. 6292-6300, 2011.

ROBINETTE, R. A.; OLI, M. W.; MCARTHUR, W. P.; BRADY, L. J. Beneficial immunomodulation by *Streptococcus mutans* anti-P1 monoclonal antibodies is Fc independent and correlates with increased exposure of a relevant target epitope. **J. Immunol.**, v. 183, p. 4628-4638, 2009.

RODRIGUES, J. F.; MATHIAS-SANTOS, C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; AMORIM, J. H.; CABRERA-CRESPO, J.; BALAN, A.; FERREIRA, L. C. Functional diversity of heat-labile toxins (LT) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*: differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) AND LT4 (pLT). **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 5222-5233, 2011.

RUNDEGREN, J.; ARNOLD, R. R. Differentiation and interaction of secretory immunoglobulin A and a calcium-dependent parotid agglutinin for several bacterial strains. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 288-292, 1987.

RUSSELL, M. W. Analysis of heart-reactive antibodies induced in rabbits by immunization with *Streptococcus mutans*. **J. Oral Pathol.**, v. 16, p. 234-240, 1987.

RUSSELL, M. W.; CHALLACOMBE, S. J.; LEHNER, T. Specificity of antibodies induced by *Streptococcus mutans* during immunization against dental caries. **Immunology**, v. 40, p. 97-106, 1980.

RUSSELL, M. W.; LEHNER, T. Characterisation of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. **Arch. Oral Biol.**, v. 23, p. 7-15, 1978.

RUSSELL, M. W.; WU, H. Y. Distribution, persistence, and recall of serum and salivary antibody responses to peroral immunization with protein antigen I/II of *Streptococcus mutans* coupled to the cholera toxin B subunit. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4061-4070, 1991.

RUSSELL, M. W.; WU, H. Y. *Streptococcus mutans* and the problem of heart cross-reactivity. **Crit Rev. Oral Biol. Med.**, v. 1, p. 191-205, 1990.

RYAN, E. J.; DALY, L. M.; MILLS, K. H. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. **Trends Biotechnol.**, v. 19, p. 293-304, 2001.

SALAM, M. A.; KATZ, J.; ZHANG, P.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M. Immunogenicity of Salmonella vector vaccines expressing SBR of *Streptococcus mutans* under the control of a T7-nirB (dual) promoter system. **Vaccine**, v. 24, p. 5003-5015, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. Nova York, Cold Spring Harbor, 2001.

SAMUELSON, P.; GUNNERIUSSON, E.; NYGREN, P. A.; STAHL, S. Display of proteins on bacteria. **J. Biotechnol.**, v. 96, p. 129-154, 2002.

SCHUMANN, W. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 62, p. 137-189, 2007.

SCULLY, C. M.; LEHNER, T. Opsonization, phagocytosis and killing of *Streptococcus mutans* by polymorphonuclear leukocytes, in relation to dental caries in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Arch. Oral Biol.**, v. 24, p. 307-312, 1979.

SEIFERT, T. B.; BLEIWEIS, A. S.; BRADY, L. J. Contribution of the alanine-rich region of *Streptococcus mutans* P1 to antigenicity, surface expression, and interaction with the proline-rich repeat domain. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 4699-4706, 2004.

SENPUKU, H.; IIZIMA, T.; KOGA, T.; NISIZAWA, T. Identification of human antigenic epitopes in an alanine-rich repeating region using sera from hu-PBL-SCID mice immunized with a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 11, p. 343-349, 1996.

SENPUKU, H.; MATIN, K.; ABDUS, S. M.; KURAUCHI, I.; SAKURAI, S.; KAWASHIMA, M.; MURATA, T.; MIYAZAKI, H.; HANADA, N. Inhibitory effects of

MoAbs against a surface protein antigen in real-time adherence *in vitro* and recolonization *in vivo* of *Streptococcus mutans*. **Scand. J. Immunol.**, v. 54, p. 109-116, 2001.

SENPUKU, H.; MIYAUCHI, T.; HANADA, N.; NISIZAWA, T. An antigenic peptide inducing cross-reacting antibodies inhibiting the interaction of *Streptococcus mutans* PAc with human salivary components. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4695-4703, 1995.

SHI, W.; LI, Y. H.; LIU, F.; YANG, J. Y.; ZHOU, D. H.; CHEN, Y. Q.; ZHANG, Y.; YANG, Y.; HE, B. X.; HAN, C.; FAN, M. W.; YAN, H. M. Flagellin enhances saliva IgA response and protection of anti-caries DNA vaccine. **J. Dent. Res.**, v. 91, p. 249-254, 2012.

SHIROZA, T.; SHINOZAKI-KUWAHARA, N.; HAYAKAWA, M.; SHIBATA, Y.; HASHIZUME, T.; FUKUSHIMA, K.; UDAKA, S.; ABIKO, Y. Production of a single-chain variable fraction capable of inhibiting the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase in *Bacillus brevis*: construction of a chimeric shuttle plasmid secreting its gene product. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1626, p. 57-64, 2003.

SHIVAKUMAR, K. M.; VIDYA, S. K.; CHANDU, G. N. Dental caries vaccine. **Indian J. Dent. Res.**, v. 20, p. 99-106, 2009.

SHIVARAMAIAH, S.; PUMFORD, N. R.; MORGAN, M. J.; WOLFENDEN, R. E.; WOLFENDEN, A. D.; TORRES-RODRIGUEZ, A.; HARGIS, B. M.; TELLEZ, G. Evaluation of *Bacillus* species as potential candidates for direct-fed microbials in commercial poultry. **Poult. Sci.**, v. 90, p. 1574-1580, 2011.

SIX, H. R.; UEMURA, K. I.; KINSKY, S. C. Effect of immunoglobulin class and affinity on the initiation of complement-dependent damage to liposomal model membranes sensitized with dinitrophenylated phospholipids. **Biochemistry**, v. 12, p. 4003-4011, 1973.

SMITH, D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. **Crit Rev. Oral Biol. Med.**, v. 13, p. 335-349, 2002.

SMITH, D. J. Prospects in caries vaccine development. **J. Dent. Res.**, v. 91, p. 225-226, 2012.

SMITH, D. J.; MATTOS-GRANER, R. O. Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 319, p. 131-156, 2008.

STAAT, R. H.; LANGLEY, S. D.; DOYLE, R. J. *Streptococcus mutans* adherence: presumptive evidence for protein-mediated attachment followed by glucan-dependent cellular accumulation. **Infect. Immun.**, v. 27, p. 675-681, 1980.

STENUDD, C.; NORDLUND, A.; RYBERG, M.; JOHANSSON, I.; KALLESTAL, C.; STROMBERG, N. The association of bacterial adhesion with dental caries. **J. Dent. Res.**, v. 80, p. 2005-2010, 2001.

TAKAHASHI, I.; OKAHASHI, N.; MATSUSHITA, K.; TOKUDA, M.; KANAMOTO, T.; MUNEKATA, E.; RUSSELL, M. W.; KOGA, T. Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen. **J. Immunol.**, v. 146, p. 332-336, 1991.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **J. Dent. Res.**, v. 90, p. 294-303, 2011.

TAUBMAN, M. A.; NASH, D. A. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 555-563, 2006.

TAVARES, M. B.; SILVA, B. M.; CAVALCANTE, R. C.; SOUZA, R. D.; LUIZ, W. B.; PACCEZ, J. D.; CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; FERREIRA, L. C.; FERREIRA, R. C. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of *Streptococcus mutans* P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 59, p. 131-142, 2010.

TENOVUO, J.; LEHTONEN, O. P.; AALTONEN, A. S. Caries development in children in relation to the presence of mutans streptococci in dental plaque and of serum antibodies against whole cells and protein antigen I/II of *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, v. 24, p. 59-64, 1990.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 72, p. 211-222, 2006.

TOIDA, N.; HAJISHENGALLIS, G.; WU, H. Y.; RUSSELL, M. W. Oral immunization with the saliva-binding region of *Streptococcus mutans* AgI/II genetically coupled to the cholera toxin B subunit elicits T-helper-cell responses in gut-associated lymphoid tissues. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 909-915, 1997.

TOKUDA, M.; OKAHASHI, N.; TAKAHASHI, I.; NAKAI, M.; NAGAOKA, S.; KAWAGOE, M.; KOGA, T. Complete nucleotide sequence of the gene for a surface protein antigen of *Streptococcus sobrinus*. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 3309-3312, 1991.

TON-THAT, H.; MARRAFFINI, L. A.; SCHNEEWIND, O. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1694, p. 269-278, 2004.

TROESCHEL, S. C.; THIES, S.; LINK, O.; REAL, C. I.; KNOPS, K.; WILHELM, S.; ROSENAU, F.; JAEGER, K. E. Novel broad host range shuttle vectors for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*. **J. Biotechnol.**, v. 161, p. 71-79, 2012.

TROFFER-CHARLIER, N.; OGIER, J.; MORAS, D.; CAVARELLI, J. Crystal structure of the V-region of *Streptococcus mutans* antigen I/II at 2.4 Å resolution suggests a sugar preformed binding site. **J. Mol. Biol.**, v. 318, p. 179-188, 2002.

TSUHA, Y.; HANADA, N.; ASANO, T.; ABEI, T.; YAMAGUCHI, S.; SALAM, M. A.; NAKAO, R.; TAKEUCHI, H.; KUROSAKI, N.; SENPUKU, H. Role of peptide antigen for induction of inhibitory antibodies to *Streptococcus mutans* in human oral cavity. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 137, p. 393-401, 2004.

VAN DOLLEWEERD, C. J.; CHARGELEGUE, D.; MA, J. K. Characterization of the conformational epitope of Guy's 13, a monoclonal antibody that prevents *Streptococcus mutans* colonization in humans. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 754-765, 2003.

VIDGREN, G.; PALVA, I.; PAKKANEN, R.; LOUNATMAA, K.; PALVA, A. S-layer protein gene of *Lactobacillus brevis*: cloning by polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 7419-7427, 1992.

WEHRL, W.; NIEDERWEIS, M.; SCHUMANN, W. The FtsH protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 3870-3873, 2000.

WESTERS, L.; DIJKSTRA, D. S.; WESTERS, H.; VAN DIJL, J. M.; QUAX, W. J. Secretion of functional human interleukin-3 from *Bacillus subtilis*. **J. Biotechnol.**, v. 123, p. 211-224, 2006.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1694, p. 299-310, 2004.

WONG, S. L.; YE, R.; NATHOO, S. Engineering and production of streptokinase in a *Bacillus subtilis* expression-secretion system. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 517-523, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/index.html>>. Acesso em: 18 ago. 2012.

WU, H. Y.; RUSSELL, M. W. Immunological cross-reactivity between *Streptococcus mutans* and human heart tissue examined by cross-immunization experiments. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 3545-3552, 1990.

WU, H. Y.; RUSSELL, M. W. Induction of mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. **Vaccine**, v. 16, p. 286-292, 1998.

- YANO, K.; INOUE, H.; MORI, H.; YEE, L. M.; MATSUOKA, S.; SADAIE, Y.; ASAI, K. Heterologous expression of the *Oceanobacillus iheyensis* SigW and its anti-protein RsiW in *Bacillus subtilis*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 75, p. 966-975, 2011.
- YASUI, T.; YODA, K.; KAMIYA, T. Analysis of S-layer proteins of *Lactobacillus brevis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 133, p. 181-186, 1995.
- YOUNG, V. B.; FALKOW, S.; SCHOOLNIK, G. K. The invasin protein of *Yersinia enterocolitica*: internalization of invasin-bearing bacteria by eukaryotic cells is associated with reorganization of the cytoskeleton. **J. Cell Biol.**, v. 116, p. 197-207, 1992.
- YU, H.; NAKANO, Y.; YAMASHITA, Y.; OHO, T.; KOGA, T. Effects of antibodies against cell surface protein antigen PAc-glucosyltransferase fusion proteins on glucan synthesis and cell adhesion of *Streptococcus mutans*. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2292-2298, 1997.
- ZHANG, S.; GREEN, N. M.; SITKIEWICZ, I.; LEFEBVRE, R. B.; MUSSER, J. M. Identification and characterization of an antigen I/II family protein produced by group A *Streptococcus*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 4200-4213, 2006.
- ZHAO, W.; ZHAO, Z.; RUSSELL, M. W. Characterization of antigen-presenting cells induced by intragastric immunization with recombinant chimeric immunogens constructed from *Streptococcus mutans* AgI/II and type I or type II heat-labile enterotoxins. **Mol. Oral Microbiol.**, v. 26, p. 200-220.

APÊNDICE A

Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of *Streptococcus mutans* P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain



RESEARCH ARTICLE

Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of *Streptococcus mutans* P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain

Milene B. Tavares¹, Bruno M. Silva¹, Rafael C.M. Cavalcante¹, Renata D. Souza¹, Wilson B. Luiz¹, Juliano D. Paccez¹, Paula J. Crowley², L. Jeannine Brady², Luís C.S. Ferreira¹ & Rita C.C. Ferreira¹

¹Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; and

²Department of Oral Biology, University of Florida, Gainesville, FL, USA

Correspondence: Rita C.C. Ferreira,

Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Lineu Prestes Avenue 1374, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 113 091 7408; fax: +55 113 091 7354; e-mail: ritacafe@usp.br

Received 17 November 2009; revised 23 February 2010; accepted 25 February 2010. Final version published online 12 April 2010.

DOI:10.1111/j.1574-695X.2010.00669.x

Editor: Patrick Brennan

Keywords

Streptococcus mutans; P1 protein; recombinant proteins; *Bacillus subtilis*; antibody responses; saliva-binding region.

Abstract

The oral pathogen *Streptococcus mutans* expresses a surface protein, P1, which interacts with the salivary pellicle on the tooth surface or with fluid-phase saliva, resulting in bacterial adhesion or aggregation, respectively. P1 is a target of protective immunity. Its N-terminal region has been associated with adhesion and aggregation functions and contains epitopes recognized by efficacious antibodies. In this study, we used *Bacillus subtilis*, a gram-positive expression host, to produce a recombinant N-terminal polypeptide of P1 (P1₃₉₋₅₁₂) derived from the *S. mutans* strain UA159. Purified P1₃₉₋₅₁₂ reacted with an anti-full-length P1 antiserum as well as one raised against intact *S. mutans* cells, indicating preserved antigenicity. Immunization of mice with soluble and heat-denatured P1₃₉₋₅₁₂ induced antibodies that reacted specifically with native P1 on the surface of *S. mutans* cells. The anti-P1₃₉₋₅₁₂ antiserum was as effective at blocking saliva-mediated aggregation of *S. mutans* cells and better at blocking bacterial adhesion to saliva-coated plastic surfaces compared with the anti-full-length P1 antiserum. In addition, adsorption of the anti-P1 antiserum with P1₃₉₋₅₁₂ eliminated its ability to block the adhesion of *S. mutans* cells to abiotic surfaces. The present results indicate that P1₃₉₋₅₁₂, expressed and purified from a recombinant *B. subtilis* strain, maintains important immunological features of the native protein and represents an additional tool for the development of anticaries vaccines.

Introduction

Streptococcus mutans is a major etiologic agent contributing to the causation of dental caries, one of the most common human infectious diseases (Russell, 2000). Bacterial adherence to the tooth surface involves both sucrose-dependent and -independent mechanisms in which hydrogen bonds and hydrophobic interactions are formed between the bacterial cells and the salivary components present within dental pellicles (Gibbons, 1984; Gibbons *et al.*, 1986). *Streptococcus mutans* also interacts with other oral microorganisms including primary colonizing commensal bacteria such as *Streptococcus gordonii* (Jenkinson & Lamont, 2005; Nobbs *et al.*, 2009). The complex multifactorial adherence process involves the $M_r \sim 185$ kDa, major surface antigen P1,

originally identified as Antigen I/II (Russell & Lehner, 1978), and also referred to as PAc (Koga *et al.*, 1990).

P1 family proteins are expressed by almost all oral streptococci and orthologs have now also been identified in *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* (Zhang *et al.*, 2006). P1 is also required for saliva-mediated bacterial aggregation, possibly a nonimmune host defense mechanism, which is abolished in *S. mutans* isogenic mutants in which the *spaP* (*pac*) gene has been disrupted (Lee *et al.*, 1989; Koga *et al.*, 1990). The cariogenicity of *S. mutans* is diminished in the absence of P1 in a gnotobiotic rat model (Crowley *et al.*, 1999). P1 has been reported as a promising target for protective immunity in naturally sensitized humans and has been studied as a vaccine candidate in active immunization studies in primates and rodents (Lehner

et al., 1981; Michalek *et al.*, 2001b; Smith & Mattos-Graner, 2008; Shivakumar *et al.*, 2009). Passive immunization with certain, but not all, monoclonal antibodies against P1 has also been reported to confer protection against *S. mutans* colonization in macaques (Lehner *et al.*, 1985) and human subjects (Ma *et al.*, 1987).

The primary sequence of *S. mutans* P1 shows several distinct features (see Fig. 1a). The N-terminal portion encompasses the signal peptide (amino acid residues 1–38) and an alanine-rich region (A-region, amino acid residues 186–464). The A-region shows a seven-residue periodicity that adopts an extended alpha-helix structure (Larson *et al.*, 2010). The central region has a proline-rich segment (P-region, amino acid residues 840–963); between the A- and P-regions lies a segment commonly referred to as the variable or the V-region because this is where most of the sequence differences between *S. mutans* Antigen I/II family members are clustered (Brady *et al.*, 1991). The A- and P-regions of P1 interact, and these and segments flanking them contribute to the formation of complex discontinuous epitopes (Rhodin *et al.*, 2004; Seifert *et al.*, 2004; van Dolleweerd *et al.*, 2004; McArthur *et al.*, 2007). At the C-terminal end, P1 displays cell wall and membrane-spanning regions, an LPXTG motif and a cytoplasmic tail characteristic of cell surface-localized sortase substrates (Fischetti *et al.*, 1990; Ton-That *et al.*, 2004).

The A-region located within amino-terminal end of P1 has been reported to contribute to the interaction of *S. mutans* with salivary components, including salivary agglutinin (SAG), now known to represent the lung scavenger receptor cysteine-rich protein, gp340 (Prakobphol *et al.*, 2000). Because of its interactions with salivary constituents, the A-region has sometimes been referred as the saliva-binding region (SBR) (Nakai *et al.*, 1993; Hajishengallis *et al.*, 1995, 1998). This segment of P1 competitively inhibits both adherence of *S. mutans* to immobilized SAG and aggregation in the presence of fluid-phase SAG (Crowley *et al.*, 1993); however, different determinants have been implicated in these two processes (Brady *et al.*, 1992). The A-region is also antigenic and encompasses both B-cell and T-cell epitopes

(Takahashi *et al.*, 1991; Kelly *et al.*, 1995; Senpuku *et al.*, 1996). Antibodies against this segment of P1 have been reported to block the aggregation of *S. mutans* and to reduce the development of dental caries (Takahashi *et al.*, 1991; Munro *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 2001; Michalek *et al.*, 2001a; Tsuha *et al.*, 2004).

Previous studies have reported the development of anti-carries vaccine approaches based on a recombinant P1 N-terminal region expressed in *Escherichia coli*. Usually, the recombinant *S. mutans* protein has been genetically fused to high-molecular-weight protein carriers and/or secreted into the periplasm of the host bacterial strains in order to reduce proteolytic degradation or simplify the purification process (Crowley *et al.*, 1993; Okahashi *et al.*, 1993; Hajishengallis *et al.*, 1995; Toida *et al.*, 1997; Matsumoto-Nakano *et al.*, 2008). Because hybrid proteins expressed in heterologous bacterial hosts can potentially lose important native-like immunological determinants, the generation of recombinant nonfused P1-derived peptides in an alternative expression system may result in an improved vaccine antigen and may contribute toward a better understanding of the functional and immunological features of the *S. mutans* protein.

Bacillus subtilis is a gram-positive spore-forming soil bacterium with a long history of industrial and technological uses, such as the production of proteases and fermented foods. Spores are also used as probiotics for different animal species and as growth promoters and biological control agents for several cultivated plants (Harwood, 1992; Paulitz & Bélanger, 2001; Ferreira *et al.*, 2005; Paccez *et al.*, 2006, 2007). The present knowledge of its physiology and genetics, as well as the availability of gene cloning and expression tools, make *B. subtilis* an important alternative to *E. coli* as a host for the expression of heterologous proteins with preserved biological activity devoid of lipopolysaccharide contamination that may affect immunological studies (Meima *et al.*, 2004; Westers *et al.*, 2004).

The aim of this study was to evaluate the immunological properties of a P1-derived polypeptide spanning the amino-terminus and encompassing the whole A-region and a short

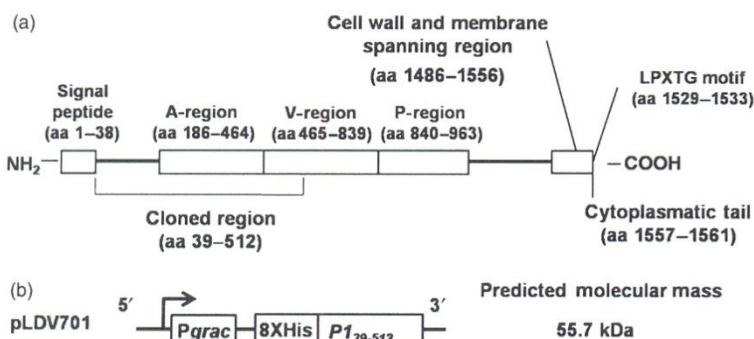


Fig. 1. Schematic representation of the *Streptococcus mutans* P1 protein (a) and the recombinant gene encoding the truncated P1₃₉₋₅₁₂ polypeptide (b) cloned in *Bacillus subtilis* pLDV701 vector. The predicted molecular mass of the recombinant P1₃₉₋₅₁₂ protein is indicated on the right of (b).

segment C-terminal, expressed and purified from a *B. subtilis* recombinant strain, and to determine its possible utility as a vaccine antigen.

Material and methods

Bacterial strains and growth conditions

All the bacterial strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *Escherichia coli* and *B. subtilis* strains were routinely cultivated in Luria–Bertani broth at 37 °C. Antibiotics were added to the growth media as necessary according to the strain and plasmids used. Competent *E. coli* cells were prepared using the CaCl₂-mediated transformation protocol (Sambrook & Russell, 2001), while natural *B. subtilis* competent cells were generated using the two-step transformation method (Cutting *et al.*, 1990). *Streptococcus mutans* strains were cultivated in brain–heart infusion broth for 16 h at 37 °C in 5% CO₂; PC3370 and PC3370C strains were grown with tetracycline (10 µg mL⁻¹) and kanamycin (500 µg mL⁻¹), respectively.

Plasmid constructions

A *B. subtilis* strain expressing a polypeptide corresponding to the *S. mutans* to aa 39–512 (P1₃₉₋₅₁₂) of the P1 protein (see Fig. 1a) was obtained after cloning the coding sequence into the plasmid pHT08 under control of the *Pgrac* promoter (Nguyen *et al.*, 2007). The *spaP* region encoding the amino-terminus of P1 through the A-region and without a signal peptide was amplified by PCR as a 1.2-kb fragment using *S. mutans* UA159 chromosomal DNA as the template and primers FWsbr (5'-AAAggATCCATggATgAAACgACCAC TAC) and RVsbr (5'-CgCgACgTCATTTggCTCAAgATCATA gAC) with restriction sites for BamHI and AatII (underlined sequences), respectively. The amplified fragment was cloned into the pGEM-T-Easy™ vector, resulting in the recombinant pGP1N vector. The pGP1N was digested with BamHI and AatII and the released fragment was subcloned into pHT08 to generate the recombinant plasmid named pLDV701. The correct nucleotide sequence of the cloned insert was confirmed by automated nucleotide sequencing.

Expression of the recombinant P1₃₉₋₅₁₂ by genetically modified *B. subtilis*

The plasmids pLDV701 and pHT08 were introduced into naturally competent *B. subtilis* WW02. One clone transformed with pLDV701 and another transformed with pHT08 was selected and the corresponding strains were named LDV701 and LDV700, respectively. Induction of protein expression and preparation of whole-cell protein extracts of genetically modified *B. subtilis* strains were

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this work

| | Main characteristics | References |
|--------------------|---|------------------------------|
| Strains | | |
| <i>S. mutans</i> | | |
| UA 159 | Km ^r | Adjic <i>et al.</i> (2002) |
| PC3370 | <i>S. mutans</i> NG8 <i>spaP</i> :: <i>tet</i> ^r | Crowley <i>et al.</i> (1999) |
| PC3370C | <i>S. mutans</i> NG8 <i>spaP</i> :: <i>tet</i> ^r ; complemented with pMAD (pDL289 + <i>spaP</i>) | Brady <i>et al.</i> (1998) |
| <i>E. coli</i> | | |
| DH5α | F ⁻ φ80dlacZΔM15Δ(lacZYA-argF) U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺ phoA supE44λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1 | Invitrogen™ |
| CG14 | M15(pREP4) carrying pCG14 | Brady <i>et al.</i> (1998) |
| <i>B. subtilis</i> | | |
| WW02 | <i>leuA8 metB5 trpC2 hsrDRM1 amyE</i> :: <i>neo</i> | Wehrl <i>et al.</i> (2000) |
| LDV700 | WW02 carrying pHT08 [empty vector – IPTG-inducible promoter (<i>Pgrac</i>)] | This work |
| LDV701 | WW02 carrying pLDV701 (P1 ₃₉₋₅₁₂ under the control of <i>Pgrac</i>) | This work |
| Plasmids | | |
| pGEM-T-Easy™ | Amp ^r ; operon lac; T-end | Promega™ |
| pCG14 | Derived from pQE-30 with a cloned <i>spaP</i> gene coding for 39 to 1561 amino acids of the P1 protein | Brady <i>et al.</i> (1992) |
| pGP1N | Amp ^r ; pGEM-T-Easy™ with cloned P1 ₃₉₋₅₁₂ | This work |
| pHT08 | Amp ^r ; Cm ^r ; IPTG-inducible <i>Pgrac</i> promoter; His-tag | Nguyen <i>et al.</i> (2007) |
| pLDV701 | Derived from pHT08 with cloned P1 ₃₉₋₅₁₂ | This work |

performed as described previously (Paccez *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2007).

Purification of the recombinant P1₃₉₋₅₁₂ expressed by *B. subtilis* strain LDV701

Bacillus subtilis cells were suspended in buffer A (0.1 M Tris HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5) and lysozyme (800 µg mL⁻¹) and incubated for 30 min to 37 °C. Sodium dodecyl sulfate (SDS) (0.01%) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (0.01 M) were added to the suspension and the cells were disrupted by sonication. The soluble supernatant was collected by centrifugation and subjected to affinity chromatography using a nickel–resin column in an AKTA FPLC device (Amersham Biosciences). Bound proteins were eluted with buffer B (0.1 M Tris HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.5) containing final imidazole concentrations ranging from 0.05 to 1 M. The recombinant *S. mutans* P1 protein was purified from

the previously described *E. coli* CG14 strain (Brady *et al.*, 1998). Expression of the recombinant protein was achieved following incubation of the *E. coli* CG14 strain in a medium containing 0.1 mM of IPTG for 4 h. The cell pellets were suspended in 0.1 M Tris HCl, 0.2 M NaCl and 4 M urea (pH 8.0) containing lysozyme ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) and incubated for 30 min to 37 °C. SDS (0.01%) and PMSF (0.01 M) were added to the suspension before sonic disruption of the cells. The soluble supernatant was applied in a nickel-affinity chromatography column and eluted under the same conditions as those described for the purification of the P₁₃₉₋₅₁₂. The protein concentrations of the eluted fractions were determined using the BCA protein quantification assay (PierceTM), with bovine serum albumin as a standard.

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blots

SDS-PAGE was performed following standard procedures using a Mini Protean II vertical electrophoresis unit (Mini-protean, BioRad). Western blots were carried out following the incubation of nitrocellulose membranes with P1-specific (1 : 3000) or anti-P₁₃₉₋₅₁₂-specific (1 : 2000) sera. The anti-P1 serum was raised in mice immunized with the recombinant P1 protein generated in *E. coli* while the anti-P₁₃₉₋₅₁₂ serum was collected from mice immunized with the protein purified from *B. subtilis* LDV701 strain. Reactive bands were detected using a chemiluminescent kit (Super SignalTM, Pierce), as described by the manufacturer.

Mouse immunizations and serum collection

BALB/c mice were supplied by the Isogenic Mouse Breeding Facility of the Department of Parasitology, Biomedical Sciences Institute (ICB), University of São Paulo (USP). All animal handling procedures were in accordance with the principles of the Brazilian code for the use of laboratory animals. Groups of five female mice, 6–8 weeks of age, were immunized subcutaneously with five doses of 10 μg of purified P1 or P₁₃₉₋₅₁₂ proteins at 2-week intervals. The first dose was administered with complete Freund's adjuvant and the subsequent doses were administered with incomplete Freund's adjuvant. The recombinant P₁₃₉₋₅₁₂ was administered as a soluble protein or after heat denaturation (boiling for 10 min) (P₁₃₉₋₅₁₂d). Antisera against whole *S. mutans* PC3370 (anti-Smu Δ P1) or PC3370C (anti-Smu) were raised by intravenous immunization of five female mice with five doses at 2-week intervals of 100 μL containing 7×10^9 CFU in phosphate-buffered saline (PBS) of whole cells harvested from cultures grown to an OD_{600 nm} of 2. Serum samples were collected 2 weeks after the last inoculation, pooled and stored at –20 °C for subsequent analysis. Samples were tested for reactivity with full-length P1 and P₁₃₉₋₅₁₂ antigens by an enzyme-linked immunosorbant

assay (ELISA). Adsorption of anti-P1 serum samples with purified P₁₃₉₋₅₁₂ or P₁₃₉₋₅₁₂d was carried out in ELISA plates previously treated with 200 ng per well of purified recombinant protein as the solid phase-bound antigen. Aliquots of anti-P1 serum diluted 1 : 10⁵ were applied to the plate wells and kept for 2 h at 37 °C. The serum samples were removed and checked for residual reactivity to the purified P₁₃₉₋₅₁₂ in Western blots. The procedure was repeated until no reaction with the P₁₃₉₋₅₁₂ was detected.

ELISA

The determination of specific antibody levels in serum samples was performed by ELISA and serial end-point titration in 96-well MaxiSorp (Nunc) plates coated with the recombinant truncated or full-length P1 proteins according to previously described procedures (Luiz *et al.*, 2008). Briefly, each purified protein tested (100 ng per well) diluted in PBS was added to the plates and kept for 16 h at 4 °C. Plates were washed twice with PBS–Tween 0.05% and then blocked with PBS–Tween – 5% milk for 2 h at 37 °C. One hundred microliters of twofold serial dilutions of the primary antibody beginning at 1/25 were added to the wells and incubated for 2 h at 37 °C. After a second washing step, peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (Sigma) (1/3000) was added and plates were incubated for 2 h at 37 °C. Following a final wash, the plates were developed with O-phenylenediamine (0.4 mg mL^{-1} ; Sigma) substrate solution containing 12% H₂O₂ and the reactions were stopped after addition of 2 M H₂SO₄. A_{492 nm} was measured on a microplate reader (LabSystem). All samples were assayed in duplicate. An absorbance value of preimmune sera was used as a reference blank. Dilution curves were drawn for each sample and end-point titers were calculated as the reciprocal values of the last dilution with an optical density of 0.05.

Immunofluorescence analysis

Streptococcus mutans PC3370 and PC3370C strains were spread on glass slides, heat fixed and evaluated for reactivity with the anti-P₁₃₉₋₅₁₂ antiserum, followed by fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse IgG (InvitrogenTM, Carlsbad, CA) as described by Homonylo-McGavin & Lee (1996). The anti-P1 antiserum and preimmune sera served as positive and negative controls. The stained cells were viewed using a Nikon TE300 inverted epifluorescence microscope (495 nm excitation, 525 nm emission).

Inhibition of saliva-mediated aggregation of *S. mutans*

Assays were carried out with clarified saliva, as described previously (Rundegren & Arnold, 1987). Aggregation and inhibition of aggregation assays in the presence of the test

- adherence and aggregation of mutans streptococci by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesion P1. *Infect Immun* **60**: 1008–1017.
- Brady LJ, Cvitkovitch DG, Geric CM, Addison MN, Joyce JP, Crowley PJ & Bleiweis AS (1998) Deletion of the central proline-rich repeat domain results in altered antigenicity and lack of surface expression of the *Streptococcus mutans* P1 adhesin molecule. *Infect Immun* **66**: 4274–4282.
- Crowley PJ, Brady LJ, Piacentini DA & Bleiweis AS (1993) Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **61**: 1547–1552.
- Crowley PJ, Brady LJ, Michalek SM & Bleiweis AS (1999) Virulence of a *spaP* mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. *Infect Immun* **67**: 1201–1206.
- Cutting S, Oke V, Driks A, Losick R, Lu S & Kroos L (1990) A forespore checkpoint for mother cell gene expression during development in *B. subtilis*. *Cell* **62**: 239–250.
- Demuth DR, Davis CA, Corner AM, Lamont RJ, Leboy PS & Malamud D (1988) Saliva mediated aggregation of *Enterococcus faecalis* transformed with a *Streptococcus sanguis* gene encoding the SSP-5 surface antigen. *Infect Immun* **57**: 1470–1475.
- Ericson T & Rundegren J (1983) Characterization of a salivary agglutinin reacting with a serotype c strain of *Streptococcus mutans*. *Eur J Biochem* **133**: 255–261.
- Ferreira LCS, Ferreira RCC & Schumann W (2005) *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. *An Acad Bras Cienc* **77**: 113–124.
- Gibbons R (1984) Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J Dent Res* **63**: 378–385.
- Gibbons R, Cohen L & Hay D (1986) Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun* **52**: 555–561.
- Hajishengallis G, Hollingshead SK, Koga T & Russell MW (1995) Mucosal immunization with a bacterial protein antigen genetically coupled to cholera toxin A2/B subunits. *J Immunol* **154**: 4322–4332.
- Hajishengallis G, Russell MW & Michalek SM (1998) Comparison of an adherence domain and a structural region of *Streptococcus mutans* antigen I/II in protective immunity against dental caries in rats after intranasal immunization. *Infect Immun* **66**: 1740–1743.
- Harwood CR (1992) *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *Trends Biotechnol* **10**: 247–256.
- Homonylo-McGavin M & Lee SF (1996) Role of the C terminus in antigen P1 surface localization in *Streptococcus mutans* and two related cocci. *J Bacteriol* **178**: 801–807.
- Huang Y, Hajishengallis G & Michalek SM (2001) Induction of protective immunity against *Streptococcus mutans* colonization after mucosal immunization with attenuated *S. enterica* serovar typhimurium expressing an *S. mutans* adhesion under control of *in vivo*-inducible *nirB* promoter. *Infect Immun* **69**: 2154–2161.
- Jakubovics N, Kerrigan S, Nobbs A, Strömberg N, Dolleweerd C, Cox D, Kelly C & Jenkinson H (2005) Functions of cell surface-anchored antigen I/II family and Hsa polypeptides in interactions of *Streptococcus gordonii* with host receptors. *Infect Immun* **73**: 6629–6638.
- Jenkinson H & Lamont RJ (2005) Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* **13**: 589–595.
- Kelly CG, Todryk S, Kendal HL, Munro G & Lehner T (1995) T-cell, adhesion, and B-cell epitopes of the cell surface *Streptococcus mutans* protein antigen I/II. *Infect Immun* **63**: 3649–3658.
- Koga T, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Asakawa H & Iwaki M (1990) Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c. *Infect Immun* **58**: 289–296.
- Larson MR, Rajashankar KR, Patel MH, Robinette RA, Crowley PJ, Michalek S, Brady LJ & Deivanayagam C (2010) Elongated fibrillar structure of a streptococcal adhesin assembled by the high-affinity association of {alpha} - and PPII-helices. *Proc Natl Acad Sci*, DOI: 10.1073/pnas.0912293107.
- Lee S, Progulsk-Fox A & Bleiweis AS (1988) Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen, P1 (I/II), in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **56**: 2114–2119.
- Lee S, Progulsk-Fox A, Erdos GW, Piacentini D, Ayakawa GY, Crowley PJ & Bleiweis AS (1989) Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P1 (I/II). *Infect Immun* **57**: 3306–3313.
- Lehner T, Russell MW, Caldwell J & Smith R (1981) Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in Rhesus monkeys. *Infect Immun* **34**: 407–415.
- Lehner T, Caldwell J & Smith T (1985) Local passive immunization by monoclonal antibodies against streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries. *Infect Immun* **50**: 796–799.
- Luiz WB, Cavalcante RCM, Paccz JD, Souza RD, Sbrógio-Almeida ME, Ferreira RRC & Ferreira LCS (2008) Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. *Vaccine* **26**: 3998–4005.
- Ma JKC, Smith R & Lehner T (1987) Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **55**: 1274–1278.
- Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Amano A & Ooshima T (2008) Molecular interactions of alanine-rich and proline-rich regions of cell surface protein antigen c in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immun* **23**: 265–270.
- McArthur W, Rhodin N, Seifert T, Oli M, Robinette R, Demuth D & Brady LJ (2007) Characterization of epitopes recognized by

- anti-*Streptococcus mutans* P1 monoclonal antibodies. *Immunol Med Microbiol* **50**: 342–353.
- Meima R, Van Dijk JM & Bron S (2004) Expression systems in *Bacillus*. *Protein Expression Technologies* (Baneyx F, ed), pp. 199–252. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.
- Michalek SM, Huang Y & Hajishengallis G (2001a) Induction of protective immunity against *Streptococcus mutans* colonization after mucosal immunization with attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing an *S. mutans* adhesion under the control of *in vivo*-inducible *nirB* promoter. *Infect Immun* **69**: 4344–4349.
- Michalek SM, Katz J & Childers NK (2001b) A vaccine against dental caries: an overview. *Biodrugs* **15**: 501–508.
- Munro G, Evans P, Todryk S, Buckett P, Kelly CG & Lehner T (1993) A protein fragment of Streptococcal cell surface antigen I/II which prevents adhesion of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **61**: 4590–4598.
- Nakai M, Okahashi N, Ohta H & Koga T (1993) Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. *Infect Immun* **61**: 4344–4349.
- Nguyen HD, Phan TTP & Schumann W (2007) Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **55**: 89–93.
- Nobbs A, Lamont RJ & Jenkinson H (2009) *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol R* **73**: 407–450.
- Okahashi N, Takahashi I, Nakai M, Senpuku H, Nisizawa T & Koga T (1993) Identification of antigenic epitopes in an alanine-rich repeating region of surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **61**: 1301–1306.
- Paccez JD, Luiz WB, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira RCC, Schumann W & Ferreira LCS (2006) Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. *Vaccine* **24**: 2935–2943.
- Paccez JD, Nguyen HD, Luiz WB, Ferreira RCC, Sbrogio-Almeida ME, Schuman W & Ferreira LCS (2007) Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. *Vaccine* **25**: 4671–4680.
- Pancholi V & Fischetti VA (1989) Identification of an endogenous membrane anchor-cleaving enzyme for group A streptococcal M protein. Its implication for the attachment of surface proteins in gram-positive bacteria. *J Exp Med* **170**: 2119–2133.
- Paulitz TC & Bélanger RR (2001) Biological control in greenhouse systems. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 103–133.
- Prakobphol A, Xu F, Hoang VM *et al.* (2000) Salivary agglutinin, which binds *Streptococcus mutans* and *Helicobacter pylori*, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. *J Biol Chem* **275**: 39860–39866.
- Rhodin NR, Cutalo JM, Tomer TN, McArthur WP & Brady LJ (2004) Characterization of the *Streptococcus mutans* P1 epitope recognized by immunomodulatory monoclonal antibody 6-11A. *Infect Immun* **72**: 4680–4688.
- Robinette RA, Oli MW, McArthur WP & Brady LJ (2009) Beneficial immunomodulation by *Streptococcus mutans* anti-P1 monoclonal antibodies is Fc independent and correlates with increased exposure of a relevant target epitope. *J Immunol* **183**: 4628–4638.
- Rundegren JL & Arnold RR (1987) Bacteria-agglutinating characteristics of secretory IgA and a salivary agglutinin. *Adv Exp Med Biol* **216**: 1005–1013.
- Russell R (2000) Pathogenesis of oral streptococci. *Gram-Positive Pathogens* (Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA & Rool JL, eds), pp. 272–279. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Russell RRB & Lehner T (1978) Characterization of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype c. *Arch Oral Biol* **23**: 7–15.
- Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schumann W (2007) Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Adv Appl Microbiol* **62**: 137–189.
- Seifert T, Bleiweis AS & Brady LJ (2004) Contribution of the alanine-rich region of *S. mutans* P1 to antigenicity, surface expression, and interaction with the proline-rich repeat domain. *Infect Immun* **72**: 4699–4706.
- Senpuku H, Iizima T, Yamaguchi Y, Nagata S, Ueno Y, Saito M, Hanada N & Nisizawa T (1996) Immunogenicity of peptides coupled with multiple T-cell epitopes of a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Immunology* **88**: 275–283.
- Senpuku H, Yanagi K & Nisizawa T (1998) Identification of *Streptococcus mutans* PAc peptide motif binding with human MHC class II molecules (DRB1*0802, *1101, *1401 and *1405). *Immunology* **95**: 322–330.
- Shivakumar KM, Vidya SK & Chandu GN (2009) Dental caries vaccine. *Indian J Dent Res* **20**: 99–106.
- Smith DJ & Mattos-Graner RO (2008) Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. *Curr Top Microbiol* **319**: 131–156.
- Takahashi I, Okahashi N, Matsushita K, Tokuda M, Kanamoto T, Munekata E, Russell MW & Koga T (1991) Immunogenicity and protective effect against oral colonization by *Streptococcus mutans* of synthetic peptides of a streptococcal surface protein antigen. *J Immunol* **146**: 332–336.
- Terpe K (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biot* **72**: 211–222.
- Toida N, Hajishengallis G, Wu H & Russell MW (1997) Oral immunization with saliva-binding region of *Streptococcus mutans* Ag I/II genetically coupled to the cholera toxin B subunit elicits T-helper-cell responses in gut-associated lymphoid tissues. *Infect Immun* **65**: 909–915.
- Ton-That H, Marraffini LA & Schneewind O (2004) Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 269–278.

- Tsuba Y, Hanada N, Asano T, Abeis T, Yamaguchi S, Salam M, Nakao R & Takeuchi H (2004) Role of peptide antigen for induction of inhibitory antibodies to *S. mutans* in the human oral cavity. *Clin Exp Immunol* **137**: 393–401.
- van Dolleweerd CJ, Kelly CG, Chargelegue D & Ma J (2004) Peptide mapping of a novel discontinuous epitope of the major surface adhesin from *Streptococcus mutans*. *J Biol Chem* **279**: 22198–22203.
- Wehrl W, Niederweis M & Schumann W (2000) The FtsH protein accumulates at the septum of *Bacillus subtilis* during cell division and sporulation. *J Bacteriol* **182**: 3870–3873.
- Westers H, Darmon E, Zanen G, Veening JW, Kuipers OP, Bron S, Quax WJ & Van Dijl JM (2004) The *Bacillus* secretion stress response is an indicator for alpha-amylase production levels. *Lett Appl Microbiol* **39**: 65–73.
- Westers L, Dijkstra DS, Westers H, Van Dijl JM & Quax WJ (2005) Secretion of functional human interleukin-3 from *Bacillus subtilis*. *J Biotechnol* **123**: 211–214.
- Wong SL, Ye R & Nathoo S (1994) Engineering and production of streptokinase in a *Bacillus subtilis* expression–secretion system. *Appl Environ Microb* **60**: 517–523.
- Zhang P, Jespersgaard C, Lamberty-Mallory L, Katz J, Huang Y, Hajishengallis G & Michalek SM (2002) Enhanced immunogenicity of a genetic chimeric protein consisting of two virulence antigens of *Streptococcus mutans* and protection against infection. *Infect Immun* **70**: 6779–6787.
- Zhang S, Green NM, Sitkiewicz I, LeFebvre RB & Musser JM (2006) Identification and characterization of an antigen I/II family protein produced by group A *Streptococcus*. *Infect Immun* **74**: 4200–4213.

APÊNDICE B

Avaliação da influência das condições de cultivo e método de purificação na recuperação de esporos de *B. subtilis* com alto grau de pureza e rendimento

Ao longo das últimas décadas houve um aumento considerável no uso de esporos de *B. subtilis* como ferramenta biotecnológica, particularmente como probiótico e como veículo vacinal (CUTTING et al., 2011; FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005). Entretanto, pouca ou nenhuma atenção foi dada ao processo pelo qual os esporos são obtidos, assim como o grau de pureza do material em relação às células vegetativas, a qual pode ter influência sobre as respostas imunológicas aos antígenos expressos na capa do esporo. Assim, a produção de amostras de esporos puras e com alto rendimento representa um etapa primordial no desenvolvimento de vetores vacinais baseados em esporos. Diferentes protocolos de esporulação e de purificação já foram propostos, porém um método é largamente referido como padrão (NICHOLSON et al., 1990) e usado por muitos grupos de pesquisa (DRAGON et al., 2001; HAGEMAN et al., 1984; MONTEIRO et al., 2005). Entretanto, os dados quantitativos e até mesmo qualitativos sobre o nível de pureza ou rendimento são pobremente descritos (HARROLD et al., 2011; LAFLAMME et al., 2004). Desde que nosso trabalho envolve os esporos de *B. subtilis* como veículo vacinal, nós realizamos uma análise qualitativa e quantitativa da influência das condições de cultivo e procedimentos de purificação para à geração de amostras de esporos de *B. subtilis* puras e com alto rendimento. O trabalho envolveu o crescimento da linhagem laboratorial 1012 de *B. subtilis* em dois meios de esporulação (DSM e Foerster). Além disso, o estado físico do meio (líquido ou sólido) e o tempo de cultivo também foram avaliados. Por fim, aplicamos a essas condições de cultivo dois métodos de purificação de endosporos, um amplamente usado pelos grupos de pesquisa (Nicholson) e outro desenvolvido pelo nosso grupo, que é uma otimização do método descrito por Nicholson (denominado de Liozima/SDS). Os dados demonstraram que a frequência de esporulação é fortemente influenciada pelo meio de cultivo, estado físico e tempo de incubação usado, sendo os melhores

resultados encontrados para a combinação meio Foerster líquido com crescimento por 72 horas (74.2%). Em relação a pureza, as amostras tratadas com o método simplificado denominado de Lisozima/SDS atingiram taxas de pureza superiores a 93.5%, independente das condições de cultivo. Além disso, a avaliação qualitativa destas amostras demonstrou que a preparação usando Lisozima/SDS resultou em amostras livres de debris celulares. Quanto ao rendimento valores elevados de 7×10^{10} esporos foram obtidos após emprego do método Lisozima/SDS. Em conclusão, demonstramos que a purificação de esporos de pode ser significativamente melhorada, tanto no quesito pureza quanto no rendimento pelo simples ajuste das condições de cultivo e método de purificação. Os resultados representam uma contribuição relevante para aqueles que almejam o uso de *B. subtilis* na investigação das respostas imunológicas usando esporos como veículo vacinal vivo ou como probiótico. Os dados foram agrupados aceitos para publicação na revista Current Microbiology, o manuscrito enviado está em anexo.

***Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: optimization of growth conditions and purification method**

Milene B. Tavares^{a,c}, Renata D. Souza^{a,c}, Wilson B. Luiz^a, Rafael C.M. Cavalcante^b, Caroline Casaroli^a, Eduardo G. Martins^a, Rita C.C. Ferreira^a and Luís C.S.Ferreira^{a,*}.

^a Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Vaccine Development Laboratory, Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

*Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Avenida Lineu Prestes, 1374, SP 05508-900, São Paulo, Brazil. Phone: (+55-11) 3091-7338. Fax: (+55-11) 3091-7354. E-mail: lcsf@usp.br

Running title: Purification of *B. subtilis* endospores.

Key words: endospores, *Bacillus subtilis*, spore purification, *B. subtilis* spores, yield.

^c Both authors contributed equally to this study.

ABSTRACT

Bacillus subtilis endospores have applications in different fields including their use as probiotics and antigen delivery vectors. Such specialized applications frequently require highly purified spore preparations. Nonetheless, quantitative data regarding both yields and purity of *B. subtilis* endospores after application of different growth conditions and purification methods are scarce or poorly reported. In the present study, we conducted several quantitative and qualitative analyses of growth conditions and purification procedures aiming generation of purified *B. subtilis* spores. Based on two growth media and different incubations conditions, sporulation frequencies up to 74.2% and spore concentrations up to 7×10^9 spores/ml were achieved. Application of a simplified spore isolation method, in which samples were incubated with lysozyme and a detergent, resulted in preparations with highly purified spores at the highest yields. The present study represents, therefore, an important contribution for those working with *B. subtilis* endospores for different biotechnological purposes.

1. INTRODUCTION

Bacillus endospores represent the most resilient live form on our planet and reflect the outcome of precisely regulated genetic networks leading to unique cellular structures [11]. In addition, *Bacillus* spores, particularly those produced by *B. subtilis*, have received growing interest as cellular tools with different biotechnological applications. For instance, *B. subtilis* spores have been successfully used as probiotics for humans and animals, as bioindicators for the validation of sterilization processes and as heat-stable live vaccine vectors, in which target antigens are genetically fused to spore coat proteins or expressed after spore germination [1, 3, 7, 9, 13]. Nonetheless, contamination of spore preparations with viable or inactivated vegetative cells, or even cell debris, may cover the immune responses induced by the spore-associated antigens. Therefore, production of highly purified spores at high yields represents an essential process in the development of spore-based vaccine vectors.

Production and purification of *B. subtilis* spores, as well as other *Bacillus* species, involve two major steps. The first one is the generation of a good spore crop that can be achieved only at specific growth conditions, and the second step is the spore purification procedure itself in which spores must be separated from non-sporulating cells and cellular debris. Several spore purification protocols have been reported using different *Bacillus* species but quantitative data of the recovery yields and purity levels, regarding contamination with vegetative cells and cellular debris, are usually poorly reported [2, 5, 10]. In fact, the *Bacillus* spore purification methods, current described in the literature, make use of laborious and rather expensive technologies [6,8].

In an attempt to improve the reproducibility of the method and obtain samples at high purity and reasonable recovery yields, we performed a systematic quantitative analysis of sporulation conditions and spore purification methods using the most widely used *B. subtilis* laboratory strain cultivated under ordinary growth conditions. Based on the results generated during this study, we established a methodology which allowed high sporulation frequencies and defined the most important steps required for the purification of spores.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Bacterial culture and sporulation

The *B. subtilis* 1012 strain (*leuA8 metB5 trpC2 hsdRM1 amyE::neo*) were kindly provided by Dr. Wolfgang Schumann from University of Bayreuth, Germany. This strain is registered in *Bacillus* Genetic Stock Center (code BGSC 1A982) and has been maintained as frozen stock in our bacterial strain collection during the last 10 years. The

B. subtilis 1012 strain was initially cultivated in Luria–Bertani (LB) liquid medium with neomycin sulfate (25µg/ml) for 16 h at 37 °C in an orbital incubator shaker. Sporulation was performed in two growth media, without the addition of antibiotics: Difco Sporulation Media (DSM), described by Nicholson and Setlow [12], and the F medium, modified from Foerster and Foster [4] composed of 1% glucose, 0.1% L-glutamate, 0.05% yeast extract, 0.5% KH₂PO₄, 0.1% (NH₄)₃PO₄, 0.02% MgSO₄, 0.01% NaCl, 0.005% CaCl₂, 0.0007% MnSO₄, 0.001% ZnSO₄, 0.001% FeSO₄. Sporulation in liquid media was performed in Erlenmeyer flasks containing 20 ml of medium inoculated with 0.2 ml of an overnight grown culture. Flasks were kept at 37 °C in an orbital shaker at 200 rpm for 24 h or 72 h. Sporulation on plates was performed using 0.2 ml culture samples spread on agar plates (1.5% agar in 20 ml of medium) in a regular Petri dish (8 cm in diameter) and incubated at 37 °C for 24 h or 72 h. After incubation time, spores in the plates were resuspended in 5 ml of phosphate buffered saline (PBS) by pipetting, transferred to a 50 ml polypropylene tube and the volume was adjusted to 20 ml.

2.2. Determination of sporulation frequencies

Spore-containing *B. subtilis* cultures were serially diluted and plated on LB plates with neomycin before and after applying a heat treatment that eliminates the vegetative cells but not the spores (65 °C for 1 h). Plates were incubated for 16 h at 37 °C, and the visible colonies were counted. Sporulation frequencies were calculated as the titers of colony forming units (CFU/ml) before and after the heat treatment. Values are expressed as: (Spores titer after the heat treatment/Spores titer before the heat treatment) X 100. The experiments were independently performed at least three times, and each experiment was performed in duplicate.

2.3. *B. subtilis* spore purification methods

We compared two spore purification procedures: 1) Method 1, described by Nicholson and Setlow [12], which consists in centrifugation of cells for 10 min at 10,000 X g at 4 °C, and washing the cells with 1 M KCl and 0.5 M NaCl. The cells were suspended in 50 mM Tris HCl (pH 7.2), and lysozyme was added to a final concentration of 50 µg/ml followed by incubation at 37 °C for 1 h. After incubation, the cells and spores were pelleted and washed once with distilled water and once with 0.05% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution. After suspension by vortexing, spores were pelleted and homogenized with TEP buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.2) and 10 mM EDTA), centrifuged for 10 min at 10,000 X g at room temperature and washed three times (10 min, 10,000 X g)

with distilled water and suspended in 1 volume of water. Method 2, consists in centrifugation of the cells for 10 min at 10,000 X *g* at 4 °C and suspending the pellets with 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) containing 50 µg/ml of lysozyme. Samples were incubated for 1 h at 37 °C and washed once with 1 volume of distilled water. Pellets were centrifuged, and suspended with 0.05% SDS solution by vortexing. Samples are washed three times with distilled water and suspended in 1 volume of distilled water.

2.4. Determination of spore purity and recovery yields

Purity of the spore preparations was evaluated after serial dilutions of the spore suspensions and determination of the Spores titers before and after the heat treatment (65 °C, 1 h) that inactivates only vegetative cells. The purity values were expressed as: (Spores titer after the heat treatment/Spores titer before the heat treatment) X 100. Spore recovery yields were determined as the percentages of spores recovered after application of the purification method with regard to the initial number of spores in the culture. The values were expressed as: (Spores titer at the end of the purification procedure/Spores titer before application of the spore purification procedure) X 100. The determinations were independently repeated at least three times, and each experiment was carried out in quadruplicates. Overall efficacy values of each spore purification method were calculated as the arithmetic means of spore purity and the recovery yield of each tested procedure.

2.5. Image analysis

Samples (50 µl) of each preparation or culture were smeared onto glass slides, air-dried and analyzed using a phase-contrast microscope (EVOS fl, AMG, Bothell, USA). At least ten images of each preparation were acquired, and one representative image of each preparation was presented.

2.6. Statistical analyses

The results were analyzed with GRAPHPAD PRISM 5 software and were expressed as the means \pm SD. Statistically significant differences (** $p < 0.01$) were determined with two-way ANOVA and Student's *t*-test.

3. RESULTS and DISCUSSION

3.1. Effect of growth conditions on *B. subtilis* sporulation frequencies

Initially, we determined the sporulation frequencies of the tested *B. subtilis* strain submitted to different growth conditions. We tested two growth media (DSM and F), two incubation times (24 and 72 h) and cultures prepared in broth or plates. Under the testing conditions, the *B. subtilis* 1012 strain reached sporulation frequencies of 45.5 % and 15.1 % (with spore concentrations of 4×10^8 spores/ml and 6.7×10^8 spores/ml) in DSM broth after incubation for 24 h or 72 h, respectively (Figure 1A and Table 1). On the other hand, samples cultivated in plates reached a maximum sporulation frequency of 35.9 % after incubation for 72 h and concentrations up to 10^8 spores/ml after incubation for 24 h (Figure 1A).

Sporulations performed in F broth were more dependent of the incubation time (Figure 1B and Table 1). A sporulation frequency of 13.2% was achieved following incubation in broth for 24 h (with a spore concentration of 6.5×10^6 spores/ml) while higher sporulation frequencies (74.2%) and spore concentrations (1.2×10^9 spores/ml) were observed after incubation in broth for 72 h. Cultures prepared on plates incubated, either for 24 h or 72 h, showed sporulation frequencies that ranged from 14.4 % to 48.8 %, respectively, and spore concentrations up to 9.5×10^6 spores/ml after incubation for 24 h (Figure 1B). Collectively, these results indicate that for the widely used *B. subtilis* 1012 laboratory strain higher sporulation frequencies and spore concentrations are obtained in cultures prepared in F broth incubated for 72 h at 37 °C.

3.2. Purity of spores prepared with optimized purification method

In order to improve the spore purity and simplify the overall spore purification procedure, we compared a commonly used spore purification method (method 1) with a simplified procedure that included the lysozyme/SDS treatment (Method 2). The purity of spores obtained with method 1 ranged from 47.1% (cultures prepared in F medium for 24 h) to approximately 90% (cultures prepared in DSM medium both after 24 h or 72h) (Figure 2A). The results showed that procedures based on successive washing steps carried out only with water, detergent or lysozyme resulted in negligible to very low spore purity values (data not shown).

In contrast, treatment with method 2 resulted in highly purified spore samples (above 90% purity values in all tested conditions and cultivation times) with values ranging from 93.5% (in DSM broth after cultivation for 24 h) to 99.1 % (in F broth after cultivation for 72 h) (Figure 2 and Table 1), which were statistically

superior to the results obtained with method 1 using the same samples. Noticeably, cultures prepared in plates showed drastically different results with lower spore yields and heavier contamination with vegetative cells that tend to form clumps hard to solubilize during the spore purification process. These results indicated that the purification of *B. subtilis* spores can be significantly improved after application of a simplified variation of the original spore isolation technique and appropriate growth conditions leading to spore preparations with negligible contamination with vegetative cells (Figure 2 and Table 1).

3.3. Spore recovery yields

The two spore purification methods were compared regarding the final spore recovery yields after cultivation in DSM or F broth. The spore yields ranged from 8.9×10^3 to 2.7×10^7 spores/ml with method 1, which corresponded to 0.1% to 32% of the total number of spores initially present at the cultures. On the other hand, application of method 2 resulted in 100% spore recovery in two cultivation conditions (cultivation in DSM broth for 24 h and F broth for 72 h) with final spore yields ranging reaching values above 10^9 spores/ml (maximum value of 2×10^9 spores/ml in cultures cultivated in F broth for 72 h).

The purified spore preparations from cultures prepared in F broth for 72 h were also monitored for the presence of dead cells or cellular debris using phase contrast microscopy. As shown in Figure 3, before application of the spore purification procedures, cultures exhibited a large number of vegetative cells as well as free spores (panel A). Samples that were submitted to method 1 or 2 did not show residual vegetative cells. However, cellular debris was observed in spore samples prepared with method 1 (panel B) but not in samples prepared with method 2 (panel C). These results showed that method 2 could efficiently eliminate vegetative cells and cell debris with minimal losses of the spores with a concomitant reduction of workload and time required to complete the procedure.

Interestingly, in some samples, the final spore concentration of the purified preparations was superior to those determined in the initial cultures before application of the spore purification procedure. This fact was mainly attributed to the fact that cell filaments containing several spores were counted as a single colony during determination of the culture titer based on colony forming units (unpublished data).

Based on the purity and recovery yields of the different tested conditions procedures, we determined the overall efficacies of the two purification methods using the *B. subtilis* 1012 strain cultures cultivated in broth. As shown in Table 1, the overall efficacy of method 1 ranged from 23.6 % to 60.5% while the efficacy of method 2 ranged from 50.9% to 99.6%. Altogether, these findings demonstrated that the spore purification method 2 gave better results than method 1, particularly for samples cultivated in F and DSM broth for 72 h and 24 h, respectively.

We also evaluated the growth condition based on F medium for 72 h and spore purification method 2 with wild type *B. subtilis* strains and, spore purity values above 70% were routinely achieved (data not shown). In conclusion, we observed that high sporulation values, and consequently high spore recovery yields, require definition of proper strain-specific growth conditions (unpublished observations). We also tested the reported conditions using a different *Bacillus* specie, the *B. coagulans* strain GanedenBC³⁰ [1]. Based on the optimum growth conditions (cultivation in F broth for 72 h) and the purification method 2 spore samples with purity values of 72%, concentrations above 10^9 spores/ml were achieved and no cellular debris was observed by microscopic analysis (data not shown and figure 3D).

In conclusion, this study showed that purification of *B. subtilis* spores can be significantly improved, regarding both purity and recovery yields by means of simple adjustments of growth conditions and purification method. Based on the proposed conditions, spores of the *B. subtilis* 1012 strain could be routinely obtained at concentrations above 10^9 spores/ml with cultures prepared in under ordinary laboratory conditions without the need of biofermentors or density-gradient centrifugation. Altogether, these results represent a relevant contribution for those aiming to work with *B. subtilis* spores at high purity including the use of spores as live vaccine vectors or as probiotic.

Acknowledgments

The present study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants. We gratefully acknowledge Dr. A. L. Sonenshein, from Tufts University, for the critical reading the manuscript and helpful suggestions. We also acknowledge the skillful technical assistance of L.C. Silva.

REFERENCES

1. Cutting SM (2011) *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 28(2):214-20.
2. Dragon DC, Rennie RP (2001) Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores. *Lett Appl Microbiol* 33:100-105.
3. Ferreira LCS, Ferreira RC, Schumann W (2005) *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. *An Acad Bras Cienc* 77:113-124.
4. Foerster HF, Foster JW (1966) Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 91:1333-1345.
5. Hageman JH, Shankweiler GW, Wall PR, Franich K, McCowan GW, Cauble S M, Grajeda J, Quinones C (1984) Single, chemically defined sporulation medium for *Bacillus subtilis*: growth, sporulation, and extracellular protease production. *J Bacteriol* 160:438-441.
6. Harrold ZR, Hertel MR, Gorman-Lewis D (2011). Optimizing *Bacillus subtilis* spore isolation and quantifying spore harvest purity. *J Microbiol Methods* 87(3):325-329.
7. Klämpfl TG, Isbary G, Shimizu T, Li YF, Zimmermann JL, Stolz W, Schlegel J, Morfill GE, Schmidt HU (2012). Cold atmospheric air plasma sterilization against spores and other microorganisms of clinical interest. *Appl Environ Microbiol* 78(15):5077-5082.
8. Laflamme C, Lavigne S, Ho J, Duchaine C (2004). Assessment of bacterial endospore viability with fluorescent dyes. *J Appl Microbiol* 96(4):684-692.
9. Luiz WB, Cavalcante RCM, Paccetz JD, Souza RD, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira RRC, Ferreira LCS (2008) Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. *Vaccine* 26:3998–4005.
10. Monteiro SM, Clemente JJ, Henriques AO, Gomes RJ, Carrondo MJ, Cunha AE (2005) A procedure for high-yield spore production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Prog* 21:1026-1031.
11. Nicholson WL, Munakata H, Horneck G, Melosh HJ, Setlow P (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:548-572.
12. Nicholson WL, Setlow P (1990) Sporulation, Germination and Outgrowth. In: C.R. Harwood and S.M. Cutting (Eds) *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd, pp 391-429.

13. Paccez JD, Nguyen HD, Luiz WB, Ferreira RCC, Sbrogio-Almeida ME, Schumann W, Ferreira LCS (2005) Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. *Vaccine* 25:4671-4680.

Table 1: Comparison of spore purification methods regarding purity and recovery yields using the *B. subtilis* 1012 strain.

| Medium (Broth) | Incubation (h) | Sporulation frequency (%) ¹ | Purity (%) | | Yield (%) | | Efficacy (%) | |
|-------------------|-------------------|---|---------------------|------|---------------------|-----|---------------------|------|
| | | | Method ² | | Method ² | | Method ² | |
| | | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| DSM | 24 | 45.5 | 89 | 93.5 | 32 | 100 | 60.5 | 96.7 |
| | 72 | 15.1 | 87.9 | 97.7 | 3.6 | 4.7 | 45.7 | 51.2 |
| F | 24 | 13.2 | 47.1 | 95.6 | 0.14 | 6.1 | 23.6 | 50.9 |
| | 72 | 74.2 | 82.4 | 99.1 | 0.7 | 100 | 41.5 | 99.6 |

- 1 - Sporulation frequencies represent the number of vegetative cells giving rise to a viable spore. The values were expressed as (spores titer/culture titer) X 100 before application of the tested spore purification methods. Culture titers (vegetative cells and spores) and spores titers were determined before and after application of the heat treatment at 65 °C for 1 h, respectively.
- 2 - Spore purification procedures: method 1 as previously described by Nicholson and Setlow [12] and method 2, the lysozyme/SDS treatment as described in the Material and methods.

LEGENDS

Figure 1: Effects of different growth conditions on the sporulation frequency of the *B. subtilis* 1012 strain. (A) Cultivation in DSM medium. (B) Cultivation in F medium. Bars values represent percentage of sporulation frequency. Total number of viable spores are indicated by symbols (Δ) connected by a dotted line. Values represent the averages of three independent experiments.

Figure 2: Evaluation of the spore preparations after application of the spore purification methods 1 or 2. (A) Purity of the spore preparations after purification. Bacterial cultures were incubated for 24 h or 72 h in DSM (black bars) or F medium (open bars) broth. (B) Spore recovery yields of purified samples. The values were expressed as total of viable spore in 20 mL cultures. The results represent the average of three independent experiments carried out in duplicate. Statistically significant difference (** $p < 0.01$).

Figure 3: Microscopic examination of the spore preparations after application of the different spore purification methods. All samples were cultivated in F broth for 72 h at 37°C. Samples: (A) initial bacterial culture before application of the spore purification methods; (B) spores prepared with method 1; (C) spores prepared with method 2; (D) *B. coagulans* spore preparation after purification using method 2. Magnitude: 600 x. Upper right side digital zoom (additional amplification of 5x).

Figure 1

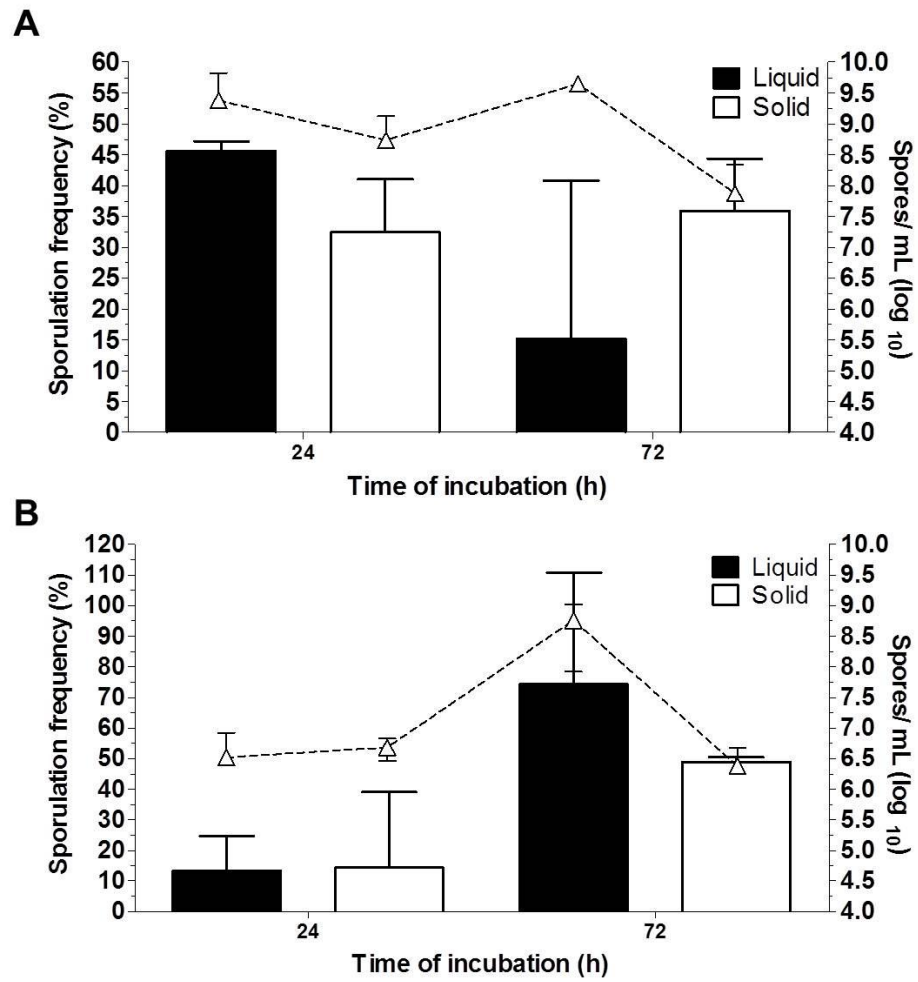


Figure 2

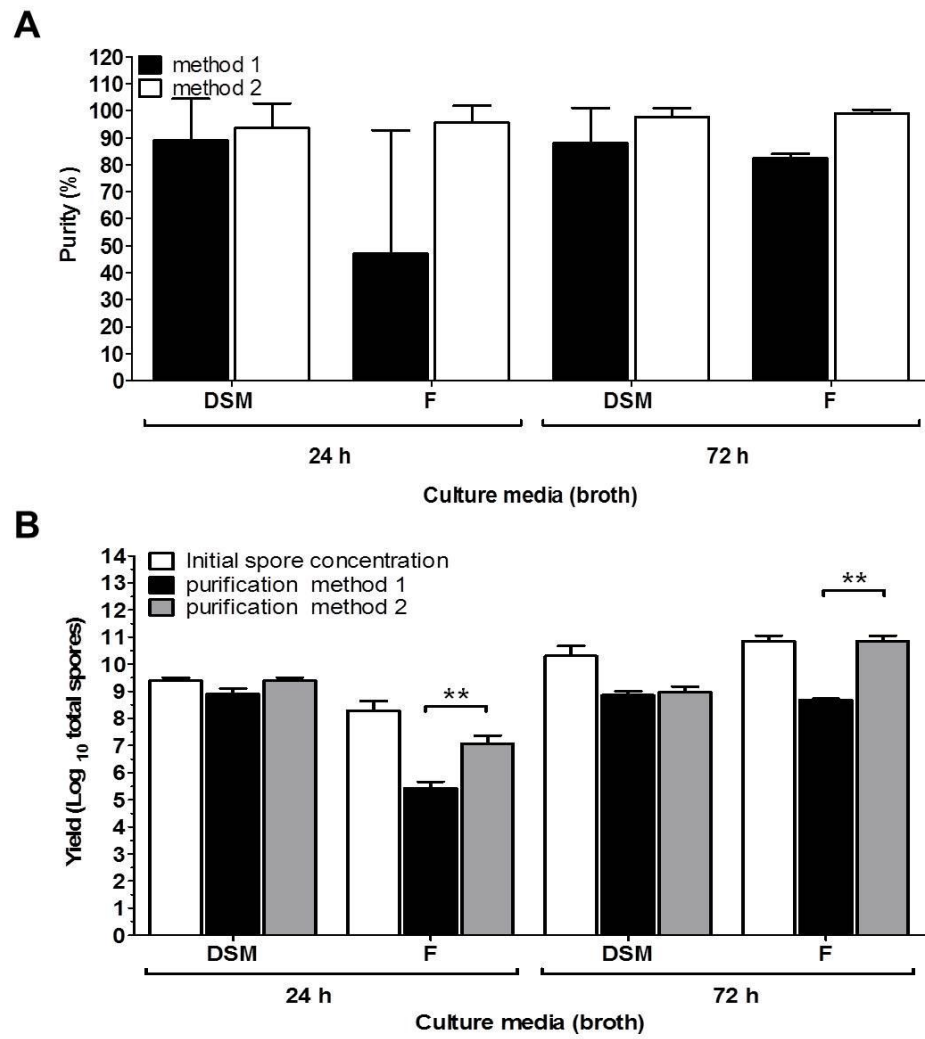
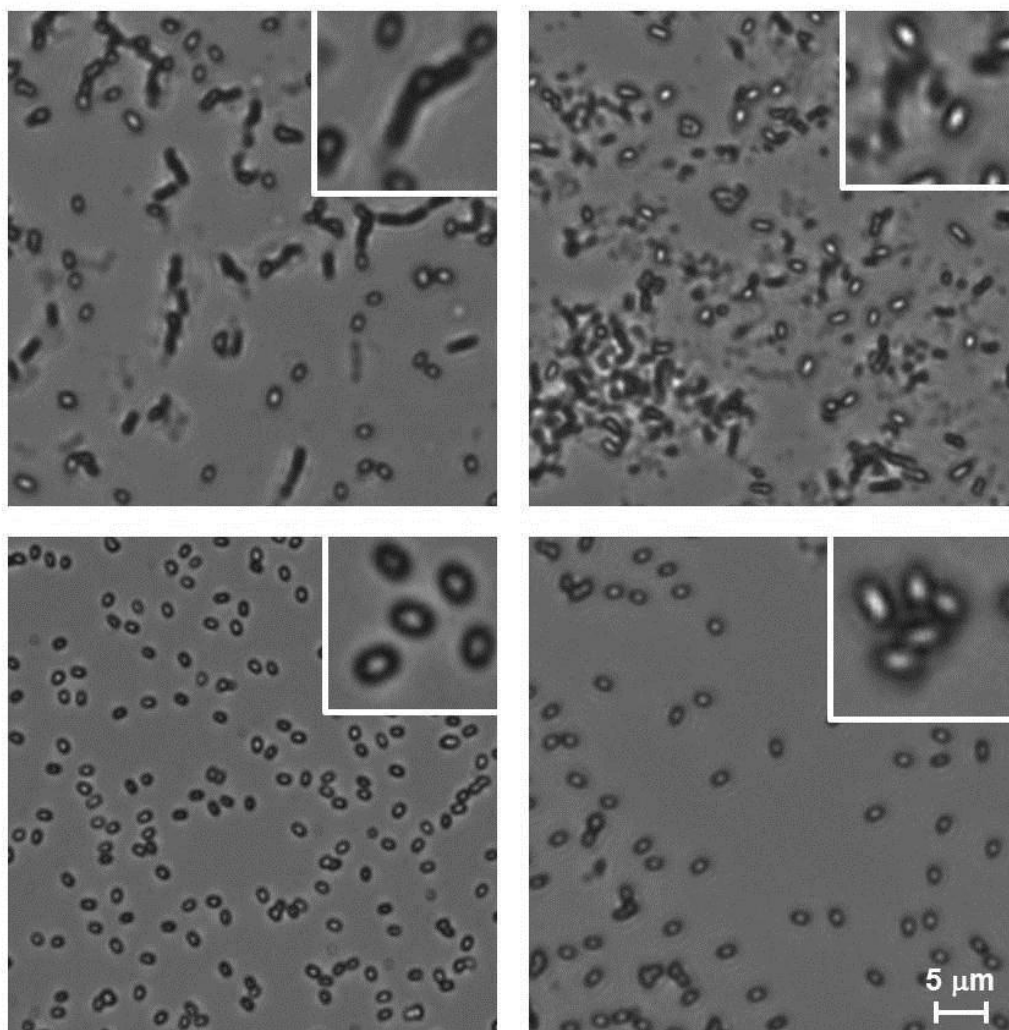


Figure 3



APÊNDICE C

Súmula curricular

1. Formação

Doutoramento

Pós-graduação do Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo (USP). (Março/2007 até presente data).

Graduação

Bacharelado em Odontologia – Universidade de São Paulo (USP). (Janeiro/2001 até Dezembro/2006).

Iniciação Científica

Laboratório CEVAT-GENE. Início: Julho/2003-Término: Janeiro/2007. Apoio financeiro: FAPESP.

Título do projeto: "Caracterização da proteína transportadora de oligopeptídeo (OppA) de *Streptococcus mutans*." Orientadora: Dr. Rita de Cássia Café Ferreira.

2. Produção Científica

Nepomuceno RSL, **M.B. Tavares**, J.A. Lemos, J.L. Ribeiro, A. Balan, K. S. Guimarães, S. Cai, R.A. Burne, L.C.S. Ferreira, R. C. C. Ferreira. The oligopeptide *opp* gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence and characterization. (2007). **Oral Microbiology and Immunology 22**: 277-284.

Oshiro, E.E., **Tavares M.B.**, Suzuki, C.F., Pimenta, D.C., Angeli, C.B., Oliveira, J.C., Ferro, M.I.T., Ferreira, L.C.S., R.C.C. Ferreira (2010) Distribution and biological role of the oligopeptide-binding protein (OppA) in *Xanthomonas* species. *Genetics and Molecular Biology*, 33:341-347.

Tavares, M. B., Silva, B. M., Cavalcante, R. C.M., Souza, R. D. , Luiz, W. B., Paccez, J. D., Crowley, P. J., Brady, L. J., Ferreira, L.C.S., Ferreira R.C.C. (2010). Induction

of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of *Streptococcus mutans* P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **59**, 2: 131-142.

Tavares, M. B., R. D. Souza, Luiz, W.B., Casaroli, C., Cavalcante. R. C., Martins, E.G., **Ferreira R.C.C.**, Ferreira, L.C.S. (2012) *Bacillus subtilis* endospores at high purity and recovery yields: optimization of growth conditions and purification method. **Curr. Microbiol.**(DOI 10.1007/s00284-012-0269-2).

Tavares, M. B., Paccez, J.D., Souza, R. D., Cavalcante, R.C.M., Luiz, W. B. **Ferreira, R.C.C.**, Ferreira L. C. S. (2012). Anti-caries vaccines based on *Bacillus subtilis* spores exhibiting enhanced gut persistence and expressing the Saliva-Binding region of the *Streptococcus mutans* P1 protein . **PLoS Pathogen** (submetido à publicação).

3. Depósito de Patente Nacional:

Sequência de ácido nucléico recombinante que codifica para os aminoácidos 39 a 512 da proteína P1 do *S. mutans*, proteína recombinante e seus usos na prevenção e controle da cárie dental. **Protocolo No: 018110008382.**

4. Participações em Congressos:

Comunicações em congressos: 10 nacionais e 7 internacionais.

5. Palestras e Aulas

Curso: Graduação em Odontologia. Instituição: Universidade de São Paulo. Disciplina: Microbiologia Básica. Período: Janeiro - Abril 2004. Participação: aulas teóricas e práticas. Supervisora: Prof. Dr Rita de Cássia Café Ferreira.

Curso: Graduação em Odontologia. Instituição: Universidade de São Paulo. Disciplina: Microbiologia Básica. Período: Janeiro - Abril 2005. Participação: aulas teóricas e práticas. Supervisora: Prof. Dr Rita de Cássia Café Ferreira.

Curso: Graduação em Odontologia. Instituição: Universidade de São Paulo. Disciplina: Microbiologia Básica. Período: Janeiro - Abril 2006. Participação: aulas teóricas e práticas. Supervisora: Prof. Dr Rita de Cássia Café Ferreira.

Curso: Graduação em Medicina. Instituição: Universidade de São Paulo. Disciplina: Microbiologia Básica. Período: Janeiro - Julho 2008. Participação: aulas teóricas e práticas. Bolsista: PAE. Supervisor: Prof. Dr Luis Carlos de Souza Ferreira.

Curso: Graduação em Farmácia. Instituição: Universidade de São Paulo. Disciplina: Microbiologia Básica. Período: Julho - Setembro 2010. Participação: aulas teóricas e práticas. Bolsista: PAE. Supervisor: Prof. Dr Luis Carlos de Souza Ferreira.

Curso: Graduação em Farmácia. Instituição: Universidade de São Paulo. Disciplina: Microbiologia Básica. Período: Julho - Setembro 2011. Participação: aulas teóricas e práticas. Supervisor: Prof. Dr Luis Carlos de Souza Ferreira.

Curso: Graduação em Odontologia. Instituição: Universidade de São Paulo. Disciplina: Microbiologia Básica. Período: Janeiro - Abril 2012. Participação: aulas teóricas e práticas. Bolsista: PAE. Supervisora: Prof. Dr Rita de Cássia Café Ferreira.

Curso: Pós-graduação Departamento de Microbiologia. Disciplina: Envoltório Celular Bacteriano. Instituição: Universidade de São Paulo. Período: Setembro 2010. Participação: Aula teórica. Supervisores: Profa. Dra Silvana Cai e Profa. Dra. Rita Ferreira Café.

Curso: Pós-graduação Departamento de Microbiologia. Disciplina: Envoltório Celular Bacteriano. Instituição: Universidade de São Paulo. Período: Setembro 2011. Participação: Aula teórica. Supervisores: Profa. Dra Silvana Cai e Profa. Dra. Rita Ferreira Café.

Curso: Graduação em Biomedicina. Instituição: Universidade de São Paulo. Disciplina: Microbiologia Básica. Outubro 2011. Participação: Aula teórica e prática. Supervisor: Prof. Dr Luis Carlos de Souza Ferreira e Dra Rita de Cássia Café Ferreira.

6. Financiamentos – Bolsas Auxílios

Uma nova estratégia vacinal para o controle da carie baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis*. **Doutorado Direto** - CNPq (142178/2007-1) – Vigência: Agosto/2007 -Novembro/2007.

Uma nova estratégia vacinal para o controle da carie baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis*. **Doutorado Direto** - FAPESP (2006/59730-4) – Vigência: Novembro/2007 – Novembro/2012.

Bacillus subtilis spore-based expression and purification system for recombinant proteins. PROBRAL - CAPES / DAAD – Vigência: Agosto - Dezembro de 2008 - **Doutorado sandwich:** Universität Bayreuth, Alemanha. Departamento de genética de microrganismos. Supervisor Alemanha: Prof. Dr Wolfgang Schumann. Supervisor Brasil: Profa Dra Rita de Cássia Café Ferreira.

7. Estágios no Exterior

Universidade de Bayreuth, Bayreuth, Alemanha. Departamento de Genética. Laboratório coordenado pelo Dr. Wolfgang Schumann. Vigência: Agosto/2008 até

Dezembro/2008. Apoio Financeiro: CAPES/DAAD – PROBRAL (508/2008). Objetivo: Desenvolvimento de um novo sistema de expressão e purificação de proteínas heterólogas baseado em esporos de *B. subtilis*.

Universidade da Flórida, Gainesville, USA. Departamento de Biologia Oral, Faculdade de Odontologia. Laboratório coordenado pela Dra Linda Jeannine Brady. Vigência: Janeiro/2011 até Abril/2011. Apoio financeiro: FAPESP (**No processo:** 2006/59730-4). Objetivo: Caracterização funcional e antigênica da proteína recombinante P1₃₉₋₅₁₂ produzida em *B. subtilis* e avaliação do potencial protetor dos soros produzidos contra essa proteína.

8. Supervisão de Estágio

- a. Alunos de iniciação científica com bolsa (PIBIC –CNPq): 6
- b. Alunos de iniciação científica sem bolsa: 1

9. Participação em Cursos

"Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*."- 2006. Ministrante: Prof. Dr. Wolfgang Schumann. Local: Departamento de biotecnologia. Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas -Brasil – São Paulo.

"Principles of surface plasmon resonance in BIAcore system". 2011.

Ministrante: GE healthcare. Local: Universidade da Flórida, Gainesville, USA.

"Workshop Scientific Writing", 2012.

Ministrante: Dr. Todd Peterson e Dr. Larry McDaniel. American Society for Microbiology (ASM). Local: Universidade de São Paulo. Departamento de Microbiologia.