Hélic Moreira Passos

Novas abordagens vacinais contra *Streptococcus mutans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2017

Hélic Moreira Passos

Novas abordagens vacinais contra *Streptococcus mutans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para o Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Café Ferreira

Versão Corrigida

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Passos,Moreira Hélic.
Novas abordagens vacinais contra *Streptococcus mutans*./
Hélic Moreira Passos. -- São Paulo, 2017. 91 p.
Orientador ProfªDrª Rita de Cássia Café Ferreira.

Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Vacinas.

Versão do título para o inglês: New vaccine approaches against *Streptococcus mutans*.

1. *Streptococcus mutans*.. 2. Cárie dental.. 3. Vacinas.4. Adjuvantes. . 5. Imunização sublingual.. I. Café Ferreira, ProfªDrª Rita de Cássia, orientador. II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Hélic Moreira Passos

Título da Dissertação: Novas abordagens vacinais contra *Streptococcus mutans*

Orientadora: Dra. Rita de Cássia Café Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de **Mestrado**, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

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

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

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

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

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

ICBUSP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Uma nova abordagem vacinal de mucosa baseada em esporos de Bacillus subtilis contra Streptococcus de interesse médico***", registrado sob o protocolo nº ***87/2015***, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **19/10/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Rita de Cássia Café Ferreira**
- Membros da Equipe: *Dalva Adelina da Silva (Pós-graduanda), Hélic Moreira Passos (Pós-graduanda), Gisela de Souza Pereira (Pós-graduanda), Ewerton Lucena Ferreira (Pós-graduanda), Milene Tavares Batista (Pós-doutoranda)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***A new mucosal approach based on Bacillus subtilis spores against Streptococcus of medical interest***", protocol nº ***87/2015***, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **10/19/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Rita de Cássia Café Ferreira**
- Team members: Dalva Adelina da Silva (Graduate Student), Hélic Moreira Passos (Graduate Student), Gisela de Souza Pereira (Graduate Student), Ewerton Lucena Ferreira (Graduate Student), Milene Tavares Batista (Postdoctoral Researcher)

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	Balb/c	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	420

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

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.040/2016

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **087/2015/CEUA**, informo que o título do projeto de pesquisa da aluna **Hélic Moreira Passos** foi alterado para *" Uma nova abordagem vacinal de mucosa contra cárie dental baseada em esporos de Bacillus subtilis*" sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 03 de maio de 2016.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais - ICB/USP

ICBUSP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.110.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **087/2015/CEUA**, aprovado em 19/10/2015, e por solicitação da Profa. Dra. ***Rita de Cássia Café Ferreira***, do departamento de Microbiologia, informo que o título do projeto da aluna ***Hélic Moreira Passos*** foi alterado para "***Novas abordagens vacinais contra Streptococcus mutans***" por solicitação da banca de qualificação.

São Paulo, 22 de junho de 2017.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-coordenadora CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Lourival e Enes

Ao meu irmão Wilke Passos

Por todo apoio incondicional em todos os momentos.

E a Deus, meu Senhor por me conceder essa vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus por todo cuidado, força e sabedoria para superar as dificuldades e por me fazer acreditar em dias melhores e crer que todo esforço valeu a pena, pois tudo posso Naquele que me fortalece.

Gostaria também de agradecer as pessoas que fizeram parte desta história:

Agradeço aos meus pais, Lourival Passos e Enes Moreira, por sempre investirem em meus sonhos. Obrigada por todo amor, apoio, força e incentivo. Eu não conseguiria sem a ajuda e compreensão de vocês. Ao meu querido irmão Wilke, por todo carinho, preocupação, e incentivo constante. Agradeço também a minha cunhada Micaela e aos meus sobrinhos Will Davi e a pequenina Isadora por trazerem tanta alegria a nossa família. Agradeço a minha prima Renata por me contar tantas histórias e me deixar feliz com as suas aventuras pelo mundo e por me apoiar nas minhas escolhas. Com imenso prazer agradeço a todos os meus familiares por todas as palavras de ânimo e orações. Cada um contribuiu de forma especial, mesmo de longe eu pude desfrutar do carinho de vocês. A minha família é o meu bem mais precioso. Amos vocês!

Agradeço a Profa. Dra. Rita de Cássia, pela recepção e acolhimento ao grupo LDV. Muito obrigada pela oportunidade concedida para a realização desse trabalho e por toda contribuição para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Luís Carlos por todas as suas sugestões durante o desenvolvimento desse trabalho. Agradeço ainda por todo incentivo e conhecimentos transmitidos.

À Dalva Adelina (delina) minha querida amiga, meus sinceros agradecimentos por todo o apoio durante esses longos anos (desde a época da graduação), agradeço também pela dedicação, ajuda na parte experimental deste projeto principalmente com a manipulação dos queridos “dongos”.Obrigada por sua amizade e por todos os momentos compartilhados. Este trabalho também é fruto do seu esforço.

Ao meu querido amigo Lennon Ramos, que muitas vezes dedicou parte do seu tempo para compartilhar seus conhecimentos (técnicas, imunologia, e coisas da vida) e me ajudou todas as vezes que precisei. A parceria é forte e sempre será, tenho muito a agradecer pelo apoio não só nos momentos bons, mas também nos mais difíceis. É muito bom tê-lo como amigo e saber que sempre poderei contar com você.

À Bianca, Samuel, Alexia e Taina Taíná por todo apoio, solidariedade, conversas, risadas, desabafos, aventuras e pelos talentosos pratos para degustação aos domingos. A companhia e amizade de vocês sem duvida é valiosíssima e foi fundamental durante todo este período aqui em SP. Obrigada por tudo, por cada momento compartilhado na famosa republica “Angel”.

À Deni por toda ajuda experimental, ideias, e por todo apoio. Obrigada por sempre dizer que no final daria certo, e principalmente por me incentivar a buscar uma saída e olhar os problemas de outra forma. Deni você é um exemplo a ser seguido!

À Luana por me ajudar a planejar alguns experimentos, por se importar com o andamento do trabalho e por todas as palavras de incentivo. Nunca me esquecerei da sua gentiliza e simplicidade.

À minha querida amiga Nailma por manter firme e forte nossa amizade mesmo a quilômetros de distância e por torcer pelo meu sucesso.

Aos técnicos Eduardo Gimenes e Carolina Bertelli por toda contribuição para o bom andamento deste projeto. Muito obrigada.

Aos amigos baianos e demais companheiros do LDV por me receberam muito bem e contribuírem para um convívio harmônico e produtivo durante as atividades.

Agradeço a todos que revisaram a parte escrita desse trabalho. Muito obrigada por todas as dicas e sugestões.

Aos camundongos, pois sem eles não seria possível a realização dessa pesquisa.

Ao pessoal dos biotérios dos Departamentos de Parasitologia e Microbiologia, pelos cuidados dispensados com os animais em experimentação.

Agradeço aos colegas do grupo denominado “Strepto/Bacillus”. A Dra. Milene Batista por todo apoio inicial e conhecimentos transmitidos. A Ewerton por toda paciência, alegria e disposição para ajudar. Aos demais integrantes do grupo, Gisela, Marco, Nayara, Fagner, Lucas e as meninas da odontologia Tamires e Carol pela parceria na bancada, discussões de artigo e apresentações de seminários. Muito obrigada.

A Gisele, Secretária do programa de Pós-graduação, por toda atenção, gentileza, paciência e principalmente por me orientar diversas vezes sobre os trâmites para o deposito dessa dissertação e também por todo apoio e compreensão durante todo o meu mestrado. Simplesmente você é maravilhosa.

À funcionária do serviço de biblioteca, Tereza, pela revisão minunciosa, gentileza e serviço técnico prestado.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Àqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Muito obrigada !

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça.

Isaías 41:10

RESUMO

Passos, H. M. Novas abordagens vacinais contra S*treptococcus mutans*. [Dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Streptococcus mutans é considerado o principal agente etiológico da cárie dental humana, uma doença crônica e de caráter infeccioso. A doença apresenta uma ampla incidência e é considerada um importante problema de saúde pública mundial. A adesão inicial de *S. mutans* à superfície dental é dependente da interação da proteína de superfície P1 e a aglutinina salivar adsorvida ao dente. Sendo assim, a proteína P1 e seus fragmentos são considerados importantes alvos em novas estratégias vacinais contra a cárie dental. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar estratégias vacinais de mucosa contra *S. mutans*, em que empregamos como antígeno modelo a proteína $P1_{39-512,}$ um fragmento N-terminal derivado da proteína P1. Para esse fim, empregamos esporos não recombinantes de *Bacillus subtilis* e um mutante atóxico da toxina termo-lábil (LTK63) de *Escherichia coli enterotoxigência* (ETEC) como adjuvantes vacinais. A proteína $P1_{39-512}$ foi obtida por meio de sistema de expressão baseado em linhagem recombinante de *B. subtilis.* As formulações vacinais foram baseadas na coadministração da proteína $P1_{39-512}$ com os esporos e/ou LTK63 pela via sublingual. Os resultados obtidos demostraram as propriedades imunomoduladoras dos dois adjuvantes sobre as respostas de anticorpos. No entanto, o adjuvante LTK63 foi capaz de induzir maiores títulos de anticorpos antígeno-específicos e desencadear respostas de mucosa com a indução de anticorpos IgA secretores (S-IgA) em amostras de saliva. Além disso, a formulação com esse adjuvante induziu repostas de anticorpos mais eficientes na capacidade de reconhecer a proteína P1 nativa, expressa na superfície de linhagens de *S. mutans.* A estratégia utilizando os dois adjuvantes não foi capaz de aumentar a magnitude das respostas de anticorpos sistêmicos e de S-IgA quando comparada à administração da $P1_{39-512}$ + LTK63. Em conclusão, os resultados abrem perspectivas para o desenvolvimento de estratégias vacinais de mucosa direcionadas para o controle da cárie dental baseadas na coadministração de antígenos de *S. mutans* com o adjuvante LTK63.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, cárie dental, vacinas, adjuvantes, imunização sublingual.

ABSTRACT

Passos, H. M. New vaccine approaches against *Streptococcus mutans*.[Masters thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Streptococcus mutans is considered the major etiological agent of human dental caries, a chronic and infectious disease. The disease has a broad incidence and is considered an important worldwide public health problem. The initial adhesion of *S. mutans* to the tooth surface depends on the interaction of the surface-exposed P1 protein and the salivary agglutinin adsorbed to the tooth. Therefore, the P1 protein and fragments derived from it are considered important targets in vaccine strategies to prevent dental caries. The present work aimed to develop and characterize new mucosal vaccine strategies against *S. mutans*, using as antigen model the protein $P1_{39\text{-}512}$, a N-terminal fragment derived from the P1 protein. For this purpose, we used non-recombinant *Bacillus subtilis* spores and a non-toxic mutant of the *enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) heat-labile toxin (LTK63) as vaccine adjuvants. The $P1_{39\text{-}512}$ protein was obtained using a recombinant *B. subtilis* strain. Vaccine formulations were based on the co-administration of the $P1_{39\text{-}512}$ protein with spores and/or LTK63 via sublingual route. The results demonstrated that both adjuvants showed immunomodulatory properties on antibody responses. However, the LTK63 adjuvant was capable to induce the highest antigen-specific antibody titers and elicited mucosal responses with the induction of secretory IgA (S-IgA) antibodies in saliva samples. In addition, the formulation using this adjuvant induced enhanced responses mediated by effector antibodies capable to recognize the native P1 protein expressed on the surface of *S. mutans* strains. The combination of both adjuvants did not increase the magnitude of systemic antibody and S-IgA responses when compared to the administration of $P1_{39\text{-}512}$ + LTK63. In conclusion, the results open perspectives for the development of vaccination strategies for the control of dental caries based on the co-administration of *S. mutans* antigens and LTK63.

Keywords: *Streptococcus mutans*, dental caries, vaccines, adjuvants, sublingual immunization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do antígeno P1 de *S. mutans*. 26

Figura 2 - Representação esquemática da organização estrutural da toxina termo-lábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica.....31

Figura 3 - Representação esquemática do regime vacinal empregado.. 42

Figura 4 - Purificação da proteína recombinante $P1_{39-512}$ expressa em *B. subtilis*.. 49

Figura 5 - Purificação da proteína recombinante LTK63 expressa em *E. coli*.. 50

Figura 6 - Microscopia de contraste de fase dos esporos de *B. subtilis* da linhagem 1012 após processo de purificação 51

Figura 7 - Avaliação do efeito adjuvante dos esporos de *B. subtilis* coadministrados com a proteína $P1_{39-512}$.....52

Figura 8 - Análise da resposta de anticorpos séricos $P1_{39-512}$-específicos induzidos após regime vacinal. 53

Figura 9 - Análise da resposta de anticorpos IgA secretores induzidos após regime vacinal. 54

Figura 10 - Análise do perfil de subclasses de anticorpos IgG $P1_{39-512}$-específicos induzidos nos animais imunizados.. 55

Figura 11 - Perfil de secreção de citocinas após imunização sublingual com a $P1_{39-512}$ e adjuvantes.. 57

Figura 12 - Células secretoras de anticorpos IgA $P1_{39-512}$-especificos. 58

Figura 13 - Avaliação da capacidade dos anticorpos $P1_{39-512}$-específicos de se ligarem a epítopos conformacionais e lineares.. 59

Figura 14 - Avaliação da afinidade dos anticorpos gerados frente ao antígeno $P1_{39-512}$. 60

Figura 15 - Avaliação da capacidade dos anticorpos $P1_{39-512}$-específicos reconhecerem a proteína nativa de *S. mutans*. 61

Figura 16 - Ativação de linfócitos T $CD8^+$ produtores de INF-γ específicos para o antígeno $P1_{39-512}$. 62

Figura 17 - Ativação de linfócitos T $CD4^+$ produtores de INF-γ e IL-4 específicos para o antígeno $P1_{39-512}$.. 62

Figura 18 - Análise da resposta de anticorpos IgG $P1_{39-512}$ específicos gerados após nova estratégia de imunização. 63

Figura 19 - Avaliação da afinidade dos anticorpos gerados frente ao antígeno $P1_{39-512}$ após novo protocolo de imunização.....64

Figura 20 - Análise do perfil de subclasses de anticorpos IgG $P1_{39-512}$-específicos.....65

Figura 21 - Perfil de secreção de citocinas. 66

Figura 22 - Células secretoras de anticorpos IgA $P1_{39-512}$-especificos.. 67

LISTA DE ABREVEVIATURAS E SIGLAS

ACK	*Ammonium-Choride-Potassium*
ANOVA	*Analysis of variance (Análise de Variância simples)*
APC	*Antigen presenting cells(células apresentadoras de antígenos)*
BSA	Bovine serum albumin (Albumina do soro bovino)
CBA	*Cytometric beads assay*
$CD4^+$	*Cluster of differentiation 4^+ (grupo de diferenciação)*
$CD8^+$	*Cluster of differentiation 8^+ (grupo de diferenciação)*
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
Con A	*Concavalin A* (concanavalina A)
CT	*Cholera toxin* (toxina colérica)
DC	*Dendritic cell* (células dendríticas)
ELISA	*Enzyme Linked Immunosorbent* Assay (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)
ETEC	*Enterotoxigenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enterotoxigênica)
FITC	Fluoresceína
Gp340	Glicoproteína 340
Gtfs	Glicosiltransferases
IFN-γ	*Interferon gamma*
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse tipo 1 de imunoglobulina G
IgG2a	Subclasse tipo 2 de imunoglobulina G
IL	Interleucina
IPTG	*Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside* (isopropil β-D-1 tiogalactopiranosideo)
LB	Meio Luria-Bertani
LCN	Linfonodo cervical
LT	*Heat-labile toxin* (toxina termo-lábil)
MALT	Tecido linfoide associado à mucosa

Meio F	Meio Foerster
OPD	*o-phenylenediamine dihydrochloride*(dicloridrato de o-fenilenodiamina)
OVA	*Ovalbumin* (ovalbumina)
PBS	*Phosphate buffered saline* (Solução salina tamponada)
PE	*Phycoerythrin* (Ficoeritrina)
PEC	*Extracellular polysaccharide* (Polissacarídeo extracelular)
PMSF	*Phenylmethanesulfonyl fluoride*
SBR	*Saliva-Binding Region* (Região de Ligação a Saliva)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SICM	Sistema comum de mucosa
S-IgA	IgA secretora
T.A	Temperatura ambiente
TB	*Terrific Broth*
Th	*T helper Cells* (Células T auxiliadoras)
TLR	*Toll-like receptor* (receptor do tipo Toll)
TWEEN20	*Polysorbate 20* (Polissorbato 20)
UFC	Unidade formadora de colônia

LISTA DE SIMBÓLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Abs	Absorbância
$D.O._{600nm}$	Densidade ótica a 600 nm
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
pH	Potencial de hidrogênio
psi	*Pound force per square inch* (libra força por polegada quadrada)
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
1.1 *S. mutans* e cárie dental 22
1.2 Imunidade contra a cárie dental e o desenvolvimento de vacinas 24
1.3 Proteína P1 de *S. mutans* como candidato vacinal 25
1.4 Administração de vacinas por via de mucosa 27
1.5 Adjuvantes 29
1.6 Enterotoxinas bacterianas como adjuvantes vacinais 31
1.7 Esporos de *B. subtilis* como adjuvante vacinal 32
2 OBJETIVO 35
2.1 Objetivo geral 36
2.2 Objetivos específicos 36
3 MATERIAL E MÉTODOS 37
3.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento 38
3.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes 38
3.2.1 Expressão e purificação da proteína recombinante $P1_{39\text{-}512}$ 38
3.2.3 Expressão e purificação da proteína LTK63 39
3.3 Ensaios de *Western blotting* e Imunodetecção 40
3.4 Produção e purificação dos esporos 41
3.5 Protocolos de imunização 41
3.6 Coleta e processamento de amostras 42
3.7 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) 42
3.8 Análise da afinidade dos anticorpos $P1_{39\text{-}512}$ **específicos** 43
3.9 Análise da ligação de anticorpos à superfície de *S. mutans* 44
3.10 Obtenção e processamento de esplenócitos e linfonodos cervicais 44
3.11 Ensaio de ELISPOT 45
3.12 Avaliação do perfil de secreção de citocinas 45
3.13 Determinação das respostas de linfócitos $TCD4^+$ **e** $TCD8^+$ 46
3.14 Análises Estatísticas 46
4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes $P1_{39\text{-}512}$ **e LTK63** 48
4.2 Obtenção de esporos de *B. subtilis* purificados 51
4.3 Caracterização do potencial adjuvante dos esporos de *B. subtilis* 51
4.4 Caracterização da resposta imune humoral nos animais imunizados 53
4.5 Análise do perfil de subclasses de IgG no soro de animais imunizados 54
4.6 Determinação do perfil de secreção de citocinas 55
4.7 Determinação do número de células secretoras de anticorpos IgA $P1_{39\text{-}512}$ **específicas** 57

4.8 Análise da resposta qualitativa humoral $P1_{39-512}$ específica 58

4.8.1 Determinação do perfil de reconhecimento de epítopos conformacionais e lineares pelos anticorpos $P1_{39-512}$ 58

4.8.2 Determinação da afinidade dos anticorpos gerados frente à proteína recombinante $P1_{39-512}$ 59

4.8.3 Reatividade de anticorpos anti- $P1_{39-512}$ contra a proteína nativa P1 de S. mutans 60

4.9 Avaliação da resposta imunológica celular induzida pelas formulações vacinais 61

4.10 Novo protocolo de imunização para avaliação do efeito adjuvante dos esporos 62

5 DISCUSSÃO 68

6 CONCLUSÕES..... 76

REFERÊNCIAS* 78

APÊNDICE 90

1 INTRODUÇÃO

1.1 *S. mutans* e cárie dental

A cárie dental é uma das doenças orais mais comuns em humanos e de ampla incidência mundial, afetando 60% a 90% de crianças em idade escolar e grande maioria dos adultos, sendo considerada pela organização Mundial de Saúde (OMS) como um importante problema de saúde pública (1–3). É uma doença crônica, de caráter infeccioso, cujo processo reflete a atividade metabólica dos microrganismos do biofilme dental, que ao fermentarem carboidratos da dieta alimentar do hospedeiro, em especial a sacarose, produzem ácidos orgânicos que levam à desmineralização dos tecidos calcificados dos dentes (2,4).

O estabelecimento da cárie dental é depende de múltiplos fatores, tais como a microbiota oral cariogênica, a susceptibilidade do hospedeiro e a dieta alimentar, que interagem ao longo do tempo para a progressão da doença (2). Dentre as espécies presentes na placa dental, o *S. mutans* é a espécie mais prevalente e mais cariogênica, devido a seus atributos de virulência que permitem sua sobrevivência e colonização em condições ambientais críticas para a maioria das outras espécies (5).

S. mutans é um coco gram-positivo anaeróbio facultativo, imóvel, encontrado em lesões cariosas de superfície lisa (5–7). Além da colonização no biofilme dental, esse patógeno é associado a doenças sistêmicas graves, em particular, a endocardite infecciosa (8). Essa espécie pertence aos estreptococos do grupo Mutans, que compreende também outras bactérias colonizadoras da cavidade oral de mamíferos (9). Os estreptococos deste grupo exibem padrões bioquímicos distintos, e por isso, são representados por diferentes espécies e tipos sorológicos (sorotipos de a-k). As cepas de *S. mutans* podem ser identificadas em quatro sorotipos (c, e, f e k), sendo o sorotipo c o mais prevalente dos isolados da cavidade oral de humanos (4,10,11).

A virulência de *S. mutans* está diretamente relacionada à sua capacidade de aderir e de se acumular na superfície dental (formar biofilme). Também é capaz de metabolizar uma ampla variedade de carboidratos, produzir ácidos orgânicos, (acidogenicidade) bem como sobreviver em ambientes de baixo pH (aciduricidade) (12,13). O processo de adesão de *S. mutans* à superfície dental envolve duas etapas que podem ocorrer na presença ou ausência de carboidratos fermentáveis. O primeiro estágio, sacarose-independente, é mediado pela adesina bacteriana antígeno I/II (ou

proteína P1) que interage com receptores presentes na película dental. O segundo estágio, sacarose-dependente, é mediado pela atividade enzimática das glicosiltransferases (GTFs) e proteínas ligadoras de glucano (Gbps). Nesta fase, ocorre a produção de glucanos insolúveis, denominados polissacarídeos extracelulares (PECs), que são produzidos pelas GTFs a partir da sacarose proveniente da dieta do hospedeiro. Os glucanos, por sua vez, em combinação com proteínas extracelulares associadas à parede bacteriana, especificamente as Gbps, promovem a aderência e o acúmulo de *S. mutans* na superfície dental (14–16).

O consumo frequente de carboidratos fermentáveis, provoca uma acentuada queda no pH da cavidade oral em decorrência dos ácidos orgânicos produzidos, que pode interferir no balanço entre o processo de desmineralização e remineralização da estrutura dental. Valores de pH inferiores a 5 são críticos para a desmineralização do esmalte dental (17). Nessas condições, a taxa de desmineralização poderá exceder a taxa de remineralização, fenômeno este que, se não controlado pela capacidade tamponante da saliva, resultará no desencadeamento de lesões (cavitações) da superfície dental (18).

A acidificação da placa dental também pode influenciar a composição da microflora oral, uma vez que pode inibir o crescimento de microrganismos comensais e favorecer o crescimento de bactérias acidogênicas, como *S. mutans* (19). Essa tolerância a ácidos ocorre principalmente porque o *S. mutans* apresenta uma bomba transportadora de protons H^+ na sua membrana celular (20). Além disso, para sobreviver e multiplicar-se nesse ambiente sujeito a inúmeras flutuações, essa bactéria é capaz de adaptar-se a condições adversas, adequando-se, por exemplo, a limitadas condições de nutrientes, mudanças de temperatura e elevada tensão de oxigênio, pois apresentam mecanismos de tolerância ao estresse e vias metabólicas ativas em baixo pH, responsáveis pela proteção, reparo e controle de suas macromoléculas (21).

Ao longo dos anos medidas preventivas foram adotadas para o controle da cárie dental, como a remoção mecânica da placa, educação em saúde bucal, utilização de produtos fluoretados, aplicação de selantes, e utilização de produtos com menor teor de açúcar. Tais medidas apresentaram impacto positivo na redução no número de casos, no entanto barreiras econômicas, comportamentais ou culturais contribuem para a natureza epidêmica dessa doença a nível global. Assim o desenvolvimento de uma vacina eficaz é particularmente adequado para planos de saúde pública especialmente em ambientes onde não sejam prestados regularmente os cuidados de saúde oral (1,2).

1.2 Imunidade contra a cárie dental e o desenvolvimento de vacinas

Acredita-se que o mecanismo imunológico relacionado à imunidade protetora contra a cárie dental seja dependente das respostas dos anticorpos salivares, especificamente a S-IgA, e dos anticorpos IgG sistêmicos que alcançam a saliva a partir do fluído crevicular gengival (22). Estudos realizados ao longo de várias décadas demonstraram a viabilidade de induzir imunidade protetora contra a cárie em modelos animais, onde a imunização ativa empregando diferentes antígenos de *S. mutans* induziram respostas de anticorpos específicos na cavidade oral e/ou resposta de anticorpos sistêmicos (23). O mecanismo de ação mediado por anticorpos específicos envolvem a interação destes com os receptores de superfície da bactéria, inibindo a adesão e subsequente colonização, ou ainda, podem interagir com os domínios catalíticos de enzimas como as glicosiltrasferases que estão envolvidas na formação da placa dental. Além disso, componentes do fluido crevicular gengival, que compreendem anticorpos e componentes celulares, também podem atuar na superfície dos dentes (2,22).

O conceito de imunização contra a cárie dental existe aproximadamente desde a descoberta da doença. No entanto, até o momento não há uma vacina disponível no mercado, e um dos fatores para isto se deve a capacidade limitada das formulações vacinais testadas até hoje em induzir e manter anticorpos protetores nos fluidos da cavidade oral (23–25). As estratégias inicialmente desenvolvidas para o controle da cárie dental foram baseadas na administração de células inteiras de *S. mutans* como um possível candidato vacinal, por via intravenosa ou subcutânea, utilizando modelos animais experimentais (primatas não humanos e roedores) (2). Os resultados foram promissores em reduzir a colonização oral pelo patógeno, entretanto, estudos posteriores demonstraram que essa abordagem poderia gerar anticorpos com reatividade cruzada com as fibras cardíacas de coelhos e humanos. Consequentemente o interesse por essa abordagem diminuiu e as estratégias vacinais passaram a ser direcionadas para diferentes antígenos do patógeno (23,26,27). O *S. mutans* apresenta vários antígenos em sua superfície, incluindo os polissacarídeos antigênicos, as glicosiltransferases, as proteínas de ligação ao glucano, o antígeno III, o antígeno A, o antígeno B (antígeno I/II ou proteína P1) e os antígenos C e D. Essas estruturas de superfície foram vistas como possíveis candidatos vacinais, principalmente, por estarem associados com a interação do patógeno ao hospedeiro (22).

Poucos ensaios clínicos foram realizados para testar a eficácia da imunidade ativa contra a cárie dental em seres humanos (22). Um dos estudos realizado em um grupo de 5 voluntários demonstrou que a ingestão de cápsulas gelatinosas contendo células de *S. mutans* inativadas foi capaz de induzir a produção de anticorpos IgA na saliva, leite e lágrimas, os quais foram reativos tanto para a enzima glicosiltransferase quanto para a proteína P1. Além disso, foi observado que a concentração aumentada dos anticorpos IgA na saliva correlacionou-se com a redução do número de *S. mutans* na placa dental e na saliva, sugerindo que a presença desses anticorpos na saliva seriam os responsáveis pela redução da adesão do patógeno. A imunização oral não levou ao desenvolvimento de respostas de anticorpos IgG séricos, minimizando o risco de reatividade cruzada com tecidos do hospedeiro (28).

Abordagens empregando a imunização passiva também foram testadas em animais e em seres humanos. Nessa abordagem, anticorpos monoclonais pré-formados, direcionados contra antígenos de *S. mutans* são administrados por aplicação tópica ou fornecidos na dieta. Os resultados demostram que tais estratégias também são capazes de interferir com a colonização da bactéria na cavidade oral (29–32). No entanto, a efetividade desse tratamento foi limitada e dependente de inúmeras aplicações, uma vez que, não havendo resposta ativa desenvolvida pelo hospedeiro, não há indução de memória imunológica. Além disso, os anticorpos administrados podem permanecer na boca somente por algumas horas ou mesmo alguns dias na placa dental (1,2). Desta forma, a busca por estratégias de imunização ativa que sejam eficazes para o controle da cárie dental em humanos é extremamente necessária.

1.3 Proteína P1 de *S. mutans* como candidato vacinal

O antígeno P1 de *S. mutans*, também referido como antígeno I/II, PAc, ou antígeno B, é uma proteína de superfície celular responsável pela adesão da bactéria à película dental (4,8,33). Estudos moleculares demostraram que a família de adesinas I/II é altamente conservada entre os sorotipos de *S. mutans* e compartilham homologia com proteínas de superfície de outros estreptococos orais, além de algumas espécies não-orais como *S. agalactiae* e *S. pyogenes* (34).

A proteína P1 de *S. mutans* possui 185 kDa e apresenta uma estrutura complexa composta por múltiplas regiões conservadas, cuja sequência primária consiste em seis regiões distintas (Figura 1), que incluem: i) um peptídeo sinal, ii) uma sequência de

repetição rica em alanina na porção N-terminal (região A), iii) uma série de repetições rica em prolina (região P), iv) uma região variável entre as regiões A e P, referida como região V, v) um domínio transmembrânico, e vi) um motivo LPXTG, que permite a ancoragem da proteína à parede celular bacteriana (35,36). Os estudos de cristalografia demostraram que essa proteína apresenta uma estrutura fibrilar alongada de aproximadamente 50 nm, onde a regiões A e P estão entrelaçadas e dispostas em forma helicoidal, enquanto a região V se dobra formando uma estrutura globular (36,37).

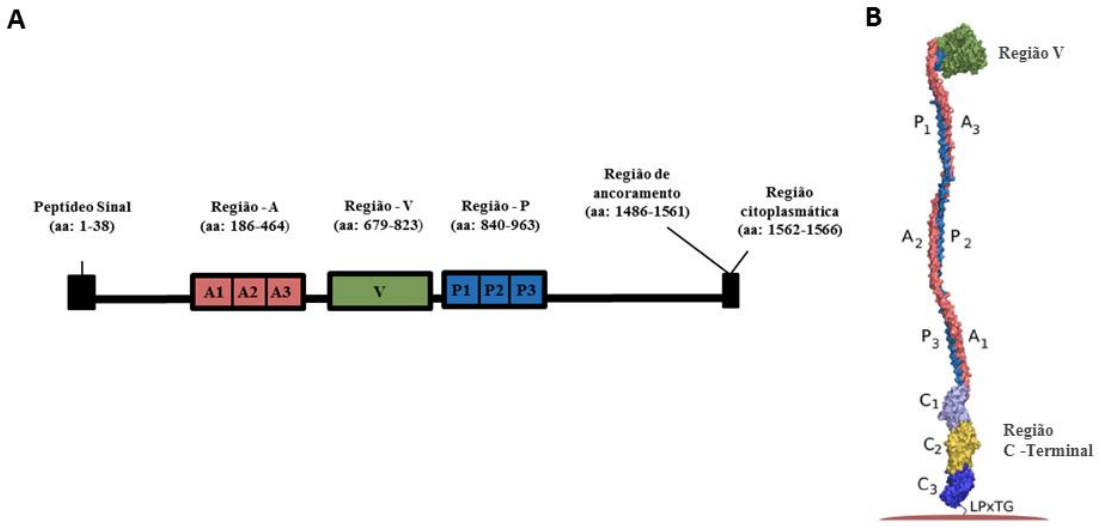

Figura 1 - Representação esquemática do antígeno P1 de *S. mutans.* A - Representação da sequência primária da proteína P1, incluindo os seus domínios estruturais com os correspondentes números de resíduos de aminoácidos. B - Modelo da estrutura terciária da proteína P1 demonstrando sua estrutura fibrilar alongada de aproximadamente 50 nm e a localização dos sítios de ligação à SAG indicados na região N-terminal que compreende a região A_3VP_1 e a porção C-terminal entre as regiões C_1-C_2.
Figura modificada de Robinette, 2014 e Larson, 2011.

A interação da proteína P1 com glicoproteínas salivares, especificamente a aglutinina salivar (SAG) permite a adesão de *S. mutans* à película dental. O componente principal da SAG é uma glicoproteína altamente glicosilada de 340 kDa (gp340) conhecida como receptor de varredura da imunidade inata. A gp340 pode interagir com a P1 sob duas formas: i) em fase fluida agrega células de *S. mutans*, o que resulta na eliminação da bactéria da cavidade oral, ii) quando adsorvida à película dental permite a aderência do *S. mutans* ao dente e, consequentemente, o seu estabelecimento no biofilme dental (38). Dentro das regiões da proteína P1 existem dois sítios de ligação a SAG, sendo um sítio localizado na porção C-terminal, entre a região C_1-C_2, e outro sítio localizado na porção N-terminal que compreende a região A_3VP_1 (figura 1 B) (36).

Evidências *in vitro* e *in vivo* indicam que anticorpos específicos contra a proteína P1 podem bloquear a adesão e, consequentemente, a colonização da cavidade oral por *S. mutans* (39). Estudos recentes têm demonstrado que, além da proteína P1 inteira, fragmentos derivados da proteína nativa, principalmente para seus domínios funcionais, são potenciais alvos em estratégias vacinais para o controle da cárie dental (2,40). Dentre os fragmentos da P1, destacamos a região A ou SBR (*Saliva-Binding Region*) como uma importante região antigênica. Esse segmento apresenta epítopos tanto para as células B quanto células T e diferentes estratégias empregando a SBR, ou peptídeos sintéticos derivados dessa sequência, quando administrados por via parenteral ou por vias de mucosa, são capazes de gerar repostas de anticorpos que podem interferir com o primeiro estágio de adesão do *S. mutans* à superfície dental (41).

Trabalhos prévios de nosso grupo demonstraram que um fragmento derivado da proteína P1 de *S. mutans*, denominado $P1_{39-512}$, que compreende três grandes domínios funcionais da proteína P1: a região pré-A, a região A ou SBR e um pequeno fragmento da região V (49 aminoácidos), produzido e purificado a partir de linhagem recombinante de *B. subtilis*, apresenta características favoráveis para o seu uso em formulações vacinais contra *S. mutans*, como a presença de epítopos lineares e conformacionais reconhecidos por anticorpos anti-P1 e imunogenicidade elevada (41). Além disso, foi demonstrado que o uso da proteína $P_{139-512}$ como antígeno vacinal em estratégias por via parenteral e de mucosa estimulou respostas de anticorpos com capacidade para bloquear a adesão de *S. mutans* à superfície abiótica, assim como neutralizar a adesão e colonização bacteriana à superfície dental de camundongos, demonstrando o potencial desse fragmento em estratégias vacinais contra a cárie dental humana (42,43).

1.4 Administração de vacinas por via de mucosa

A indução de uma resposta imunológica eficaz contra um determinado patógeno depende não somente da escolha de um antígeno promissor, mas também da via de administração utilizada. Um grande número de estudos tem demonstrado que a vacinação por via de mucosa pode estimular de forma eficiente respostas imunológicas na mucosa local, imunidade sistêmica, bem como respostas de linfócitos T citotóxicos (CTL) contra uma variedade de agentes infeciosos (44,45). Tendo em vista que a proteção contra a cárie dental está associada à resposta de anticorpos na cavidade oral, a

indução de imunidade protetora nesse sítio representa uma estratégia promissora para o desenvolvimento de vacinas contra a cárie dental.

Muitos investigadores mostraram que a exposição de um antígeno a um tecido linfoide associado à mucosa (MALT) pode dar origem a respostas imunológicas não só no local de indução, como também nas localizações adjacentes e em secreções de mucosa distantes do sítio inicial do estímulo, devido à existência de um sistema comum de mucosa (SICM), que consiste em sítios indutores e efetores de resposta imune e de vias de migração circulatória celular comum (23,44). A imunização em sítios indutivos de mucosa com antígenos de *S. mutans*, incluindo tecidos associados ao intestino ou nasofaringe, resulta na migração de células B produtoras de anticorpos IgA antígeno-específicos para órgãos efetores, como as glândulas salivares. Em seguida, essas células passam por processos de diferenciação, maturação e secretam anticorpos IgA na lâmina própria, que ao atravessarem os ductos do tecido efetor alcançam a saliva (46). Dentre as rotas mais exploradas para a imunização de mucosa encontram-se a via oral, a intranasal e, mais recentemente, a via sublingual (47–50).

Por muitos anos, a via sublingual foi utilizada na imunoterapia para tratamento de hipersensibilidade alérgica e alguns produtos sublinguais para este fim já foram aprovados e estão disponíveis comercialmente incluindo, o SLITone®, Sublivac®, Grazax®, Oralair® e AllerSlit®forte (51). A mucosa sublingual é constituída por um tecido epitelial não queratinizado, o que torna esse sítio mais permeável e adequado para entrega de medicamentos de baixo peso molecular e peptídeos imunogênicos. Além disso, é uma área bastante vascularizada com grande área superficial para absorção de antígenos e de fácil acesso para autoadministração (51,52). Apresenta em sua extensão células imunocompetentes, principalmente células dendríticas (DCs), que podem processar rapidamente o antígeno e desencadear respostas imunes antígeno-específicas no sítio da mucosa, bem como induzir respostas imunológicas sistêmicas (53).

Diversos estudos documentaram a eficácia da imunização sublingual na indução de respostas de anticorpos sistêmicos e nos sítios de mucosa utilizando diferentes modelos experimentais e uma variedade de antígenos (54–57). Contudo, antígenos solúveis quando administrados por via de mucosa são fracamente imunogênicos e por isso sistemas de entrega ou adjuvantes eficientes são necessários para compor a formulação vacinal. Tais sistemas são importantes para proteger o antígeno da degradação enzimática, direcionar o antígeno para sítios indutores da mucosa, estimular

adequadamente a reposta imune inata por meio da ativação de células dendríticas, macrófagos e células epiteliais, bem como induzir resposta imune adaptativa com a geração de células efetoras e de memória (58).

Considerando as informações descritas acima e o sítio de infecção de *S. mutans*, a via sublingual se mostra promissora para o desenvolvimento de estratégias vacinais contra a cárie dental. Um trabalho publicado em 2016 por nosso grupo de pesquisa, demostrou que a imunização sublingual de camundongos BALB/c utilizando como antígeno modelo uma proteína captadora de fosfato do sistema ABC de *S. mutans*, a proteína PstS em combinação ou não com a enterotoxina mutante LTK4R, foi capaz de estimular a produção de anticorpos sistêmicos e também ativar células secretoras de IgA no baço e linfonodos cervicais. Além disso, foi observado que os anticorpos gerados após o regime vacinal adotado foram eficientes em interferir na capacidade de colonização oral por *S. mutans* (59).

1.5 Adjuvantes

A palavra adjuvante deriva do latim “adjuvare” e significa “aquele que fornece ajuda”, sendo, portanto, qualquer composto capaz de aumentar a imunogenicidade de antígenos coadministrados e induzir proteção contra infecções (60).

Os adjuvantes podem ser classificados de acordo com suas propriedades físico-químicas, origem e mecanismos de ação. De acordo com o mecanismo de ação, esses compostos podem ser divididos em imunopotencializadores ou sistemas de entrega. Os adjuvantes do primeiro grupo ativam diretamente as células do sistema imunológico e dentre eles podemos citar exotoxinas bacterianas, citocinas, saponinas e ligantes para receptores do tipo Toll (TLR - *Toll-like receptor*). Já os adjuvantes do segundo grupo podem funcionar como transportadores, direcionando o antígeno e/ou imunopotencializador para alvos específicos do sistema imunológico como, por exemplo, células apresentadoras de antígenos (APCs). Dentro dessa segunda categoria podemos citar os lipossomas, os sais de alumínio, os agentes sulfactantes, as emulsões e as micropartículas sintéticas (61–63).

A ação dos adjuvantes sobre as respostas de defesa do hospedeiro estão relacionadas a vários mecanismos que incluem: a indução de resposta inflamatória no sítio da inoculação pela ativação de células do sistema imunológico inato, aumento da captação do antígeno por células imunocompetentes, ativação e maturação das APCs,

indução de respostas de longa duração (memória imunológica), indução de resposta imunológica em superfícies de mucosa e modulação do perfil de resposta (Th1, Th2, etc) (64,65).

Independente do mecanismo de ação, os resultados práticos do uso de adjuvantes nas formulações vacinais podem ser observados por vários aspectos. Além de aumentar a imunogenicidade intrínseca de antígenos alvos, os adjuvantes podem reduzir a quantidade de antígeno contido nas doses individuais da vacina, reduzir o número de imunizações necessárias para induzir proteção, aumentar o título funcional de anticorpos, induzir respostas imunes mais rápidas e duradouras ou ainda, melhorar as respostas imunes em populações onde as respostas às vacinas são geralmente reduzidas, como crianças, idosos e imunocomprometidos (60).

Embora efetivos adjuvantes vacinais já tenham sido identificados, poucos adjuvantes estão aprovados para uso em seres humanos. O número reduzido de adjuvantes licenciados deve-se, principalmente, à questão da segurança envolvendo efeitos secundários e toxidade dos compostos testados (60,62,66). Vale ressaltar que os adjuvantes aprovados não contemplam as necessidades de muitas formulações vacinais em desenvolvimento. Os sais de alumínio (Alúmen), por exemplo, um dos adjuvantes mais comumente aplicados em vacinas para humanos, teve sucesso em estratégias vacinais contra agentes patogênicos onde as respostas de anticorpos neutralizantes constituem o principal mecanismo de proteção. Contudo, foi demonstrado que o Alúmen exerce pouco efeito sobre as respostas de células T do tipo Th1 ou citotóxicas, que são importantes para o desenvolvimento de vacinas contra patógenos intracelulares. Além disso, esse adjuvante mostrou ser um pobre indutor de imunidade nas superfícies de mucosa (67,68).

A pesquisa por novos adjuvantes que sejam seguros e adequados para o desenvolvimento de vacinas de mucosa representa uma grande área em expansão na pesquisa médica. Uma abordagem interessante, empregada nos últimos anos, visando à otimização da resposta imunológica gerada pela imunização ativa, contempla o uso de adjuvantes contendo mais de uma molécula imunoestimuladora, formando os chamados sistemas adjuvantes. A finalidade dessa estratégia é desencadear a ativação de diferentes rotas de sinalização dento do sistema imunológico para alcançar a resposta imune desejada por meio da ação sinérgica ou do efeito aditivo da combinação dos compostos (69–72). Vários adjuvantes, e combinação destes, vêm sendo testados em ensaios clínicos, e muitos estão sendo considerados bons candidatos para compor as

formulações vacinais em diferentes sistemas (69,73). Dentre as moléculas estudadas quanto ao potencial adjuvante para utilização por vias de mucosa, destacamos as enterotoxinas e os esporos de *Bacillus subtilis.*

1.6 Enterotoxinas bacterianas como adjuvantes vacinais

Algumas toxinas bacterianas, além de desempenhar um papel importante na patogenicidade, também apresentam características adjuvantes, como a toxina colérica (CT) produzida por *Vibrio cholerae e* a toxina termo-lábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (74). Ambas as toxinas são potentes adjuvantes de mucosa quando coadministrados com antígenos solúveis (75). A LT, expressa por linhagens de ETECs isoladas de seres humanos e outros animais, apresenta um elevado grau de homologia com CT (cerca de 80% de identidade) em suas estruturas proteicas primárias e ambas são constituídas de subunidades AB5. A subunidade A enzimaticamente ativa (atividade ADP-ribosilase) com massa molecular de 28 kDa é responsável pela toxidade, enquanto que a subunidade B composta por 5 polipeptideos idênticos (11,5 kDa cada monomêro) é responsável pela ligação da toxina a receptores presentes nas superfícies das células hospedeiras, principalmente gangliosídeos do tipo GM1 (Figura 2) (74,76,77).

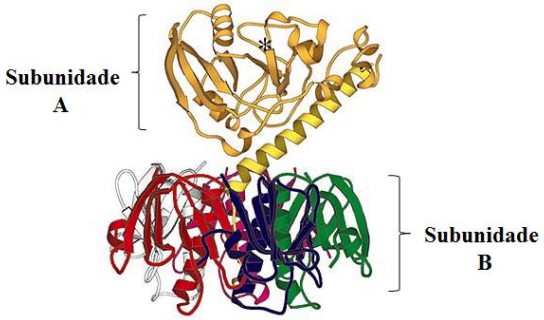

Figura 2 - Representação esquemática da organização estrutural da LT de ETEC. A subunidade A está representada em amarelo e é formada por uma porção A1 em forma globular e A2 em alfa hélice. A subunidade B composta por cinco anéis estão representadas individualmente em vermelho, branco, rosa, verde e azul (estrutura pentamêrica). O sítio ativo da subunidade A é destacado por um asterisco.
Figura adaptada de Deanakker, 1996.

Diversos estudos relatam as propriedades imunoestimuladoras de CT e LT sobre as células do sistema imune. A LT é capaz de induzir uma potente reposta imunológica humoral e celular quando administradas por diferentes vias de imunização (parenteral, transcutânea e de mucosa). O mecanismo responsável pela atividade adjuvante dessa

toxina não está completamente esclarecido, entretanto, sabe-se que a administração da toxina induz os seguintes efeitos: promove a diferenciação dos isotipos de células B levando à produção de respostas de anticorpos IgG sérico e IgA secretado na mucosa, possui efeitos inibitórios e/ou estimuladores na proliferação de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ e na produção de citocinas pró-inflamatórias e de perfis Th1/Th2/Th17, além de aumentar a capacidade de apresentação de antígenos por vários tipos de APCs (78,79).

Apesar do grande potencial dessas enterotoxinas como adjuvantes, questões relacionadas à segurança, especificamente efeitos tóxicos que podem ser observados até mesmo quando pequenas doses são administradas, tornaram o seu uso limitado em vacinas (58,69). Por isso, diferentes grupos de pesquisa dedicaram-se à obtenção de derivados atóxicos ou atenuados de LT e CT, que preservassem suas propriedades adjuvantes, pelo menos parcialmente. Uma estratégia comum para o desenvolvimento de mutantes atóxicos foi a seleção de mutações nos resíduos relacionadas à atividade de ADP-ribosilação (74,81). A LTK63 é um desses mutantes atóxicos que apresenta uma substituição de uma serina por uma lisina na posição 63 da subunidade A. A LTK63, juntamente com outros variantes, foi testada com sucesso como adjuvante de mucosa utilizando uma variedade de antígenos bacterianos, virais e peptídeos sintéticos, e foi capaz de conferir proteção em modelos experimentais apropriados (74,82). No contexto de estratégias vacinais para a cárie, as enterotoxinas CT e LT bem como seus variantes foram utilizados em fusão ou associação com antígenos de *S. mutans.* Os estudos realizados utilizaram principalmente a proteína P1 ou o fragmento SBR. As respostas avaliadas demostraram que o uso dessas toxinas foi capaz de induzir tanto respostas sistêmicas quanto de mucosa, além disso, respostas de memória antígeno-específicas também foram encontradas (83–85).

1.7 Esporos de *B. subtilis* como adjuvante vacinal

O conhecimento sobre a genética e fisiologia de *B. subtilis* torna essa espécie atrativa para sua utilização em diferentes abordagens vacinais (86,87). *B. subtilis* é um bacilo gram-positivo formador de esporos, presente de forma ubíqua na natureza. É uma espécie não patogênica, utilizada como probiótico, principalmente em algumas regiões da Ásia e Europa. Os esporos são estruturas metabolicamente quiescentes, extremamente resistentes, que podem permanecer viáveis durante períodos de tempo prolongado em condições adversas, tais como a exposição frente a produtos químicos

tóxicos, radiação ultravioleta, falta de nutrientes, desidratação e temperaturas elevadas (88,89).

Inicialmente, as linhagens de *B. subtilis* foram utilizadas para a expressão de antígenos vacinais (90). Devido a suas características físicas e biológicas, tais como estabilidade térmica e segurança para administração em humanos e animais, os esporos dessa espécie passaram a ser empregados também em abordagens que incluem a sua utilização como vetores de entrega de antígenos e adjuvantes vacinais (86,91,92). Como veículo vacinal, os esporos podem ser modificados geneticamente para expressar antígenos heterólogos logo após a sua germinação ou apresentar os antígenos em sua superfície, onde o antígeno alvo é fusionado a proteínas de revestimento da capa do esporo como a COtB, COtC ou COtG (93). Em uma segunda abordagem, uma alternativa para o uso de esporos não-recombinantes, o antígeno de interesse é adsorvido na capa dos esporos por meio das interações hidrofóbicas e eletrostáticas, ou simplesmente o antígeno é misturado e coadministrado aos esporos purificados (94,95). Esporos vivos ou inativados podem ser usados para esses propósitos e, de forma semelhante, mostram-se eficientes em modular as respostas imunológicas específicas para o antígeno, induzindo respostas específicas de IgA secretor e IgG sistêmico após administração por vias de mucosa (94).

Modelos experimentais *in vitro* ou *in vivo* demonstram que os esporos de *B. subtilis* são capazes de interagir com macrófagos e também promover a maturação de DCs (91,92). Alguns estudos evidenciam que a atividade adjuvante dos esporos de *B. subtilis* está relacionada com a interação destes com DCs por meio de receptores do tipo Toll, especificamente o TLR2 (95,96). Os membros da família de TLR são expressos por células do sistema imunológico responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (97). Uma vez ativadas, as DCs aumentam a expressão de diversas moléculas, tais como moléculas co-estimuladoras, assim como a secreção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (98). Estudos realizados em modelo murino indicam que os esporos podem modular respostas antígeno-específicas com um perfil Th1/Th2 balanceado ou induzir respostas preferencialmente Th1 (86,91,99).

Barnes e colaboradores (99) demonstraram que, em camundongos, a coadministração de esporos com antígenos solúveis por via intranasal ou subcutânea foi capaz de estimular tanto respostas imunológicas humorais quanto respostas celulares antígeno-específicas. A coadministração dos esporos foi capaz de aumentar de modo

significativo os níveis de IgG1 e IgG2a, bem como o número de células $TCD4^+$ e $CD8^+$ produtoras de IFN-γ. Além disso, os autores observaram que essa estratégia foi eficiente em induzir reposta de anticorpos IgA secretoras. Outro trabalho realizado por nosso grupo, empregando a proteína p24 do capsídeo viral do HIV (*Human Immunodeficiency Virus)* como antígeno modelo, demonstrou que a coadministração de esporos de *B. subtilis* por via parenteral apresentou um efeito adjuvante significativamente maior do que o efeito observado após a adsorção da proteína na capa dos esporos (87). Além disso, a administração de esporos promoveu a ativação de APCs e aumentou a secreção de citocinas pró-inflamatórias (95).

Em uma estratégia vacinal contra *S. mutans*, os esporos de *B. subtilis* foram utilizados como veículo de entrega de mucosa para o antígeno $P1_{39\text{-}512}$ e foram administrados por via oral, intranasal e sublingual. Nessa estratégia foram empregados esporos modificados geneticamente para expressar o antígeno alvo e também adesinas bacterinas a fim de aumentar a imunogenicidade e direcionar o antígeno alvo para as células do sistema imune de mucosa. Os resultados demonstram que os esporos adesivos induziram respostas de anticorpos com capacidade de bloquear a adesão *in vitro* de *S. mutans* à SAG imobilizada (42). Ainda não existem na literatura estudos de formulações vacinais contra o *S. mutans* empregando esporos não recombinantes de *B. subtilis* associados ou não à toxina mutante LTK63 como adjuvante vacinal. Deste modo, a realização do presente projeto teve por objetivo avaliar a ação adjuvante de esporos não recombinantes de *B. subtilis* e da toxina LTK63 como alternativa para vacinas contra o *S. mutans* baseadas na proteína recombinante $P1_{39\text{-}512}$ administradas pela via sublingual.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O presente projeto de mestrado teve como objetivo principal desenvolver e caracterizar estratégias vacinais de mucosa contra *S. mutans*, empregando esporos não recombinantes de *B. subtilis* e a toxina mutante LTK63 de ETEC como adjuvantes vacinais. Neste sentido, foram realizados ensaios de imunização pela via sublingual em camundongos BALB/c utilizando como antígeno modelo o fragmento $P1_{39-512}$ derivado do principal antígeno de superfície do *S. mutans*.

2.2 Objetivos específicos

I. Expressar e purificar a proteína recombinante $P1_{39-512}$ de *S. mutans* e a enterotoxina mutante LTK63 a partir de sistemas de expressão baseados em linhagens de *B. subtilis* e *E. coli*, respectivamente.

II. Obtenção de esporos purificados de *B. subtilis* da linhagem selvagem 1012.

III. Caracterizar as respostas imunológicas induzidas pelas formulações vacinais administradas pela via sublingual, empregando a proteína administrada de forma individual ou combinada aos adjuvantes.

IV. Verificar a funcionalidade dos anticorpos gerados após o regime vacinal frente ao reconhecimento da proteína P1 nativa expressa na superfície de diferentes sorotipos de *S. mutans*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento

Linhagens de *B. subtilis* e *E. coli* foram utilizadas para a expressão das proteínas recombinantes $P1_{39-512}$ e LTK63, respectivamente. Essas linhagens foram construídas previamente em nosso laboratório e utilizadas neste trabalho.

A linhagem de *B. subtilis* denominada LDV701, capaz de expressar a proteína $P1_{39-512,}$ foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) contendo cloranfenicol (30 μg/mL) a 37 °C sob agitação constante (200 rpm). A linhagem trasformada de *E. coli* BL21 DE03 pLys, capaz de expressar a proteína LTK63, foi cultivada em meio Terrific Broth (TB) contendo ampicilina (100 mg/mL) e mantida sob as mesmas condições descritas acima.

Para a obtenção de esporos purificados utilizamos a linhagem de *B. subtilis* 1012 cultivada inicialmente em meio LB e posteriormente transferida para meio F (meio Foerster modificado) composto por 1% de glicose, 0,1% L-glutamato, 0,05% extrato de levedura, 0,5% KH_2PO_4, 0,1 $(NH_4)_3$ PO_4, 0,02% $MgSO_{4,}$ 0,01% NaCl, 0,005% $CaCl_{2,}$ 0,0007%, $MnSO_4$ 0,001% $ZnSO_{4,}$ 0,001% $FeSO_{4.}$

3.2 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

3.2.1 Expressão e purificação da proteína recombinante $P1_{39-512}$

A expressão, e subsequente purificação, da proteína recombinante $P1_{39-512}$, utilizando a linhagem de *B. subtilis* LDV701, foi realizada de acordo com Tavares e colaboradores (41). Uma alíquota-estoque dessa linhagem foi inoculada em meio Luria-Bertani (LB) contendo cloranfenicol (30 μg/mL) e incubada a 37 °C sob agitação (200 rpm) em agitador orbital por 18 horas. Essa cultura foi utilizada como inóculo com diluição inicial de 1:50 para 3 litros de meio LB contendo cloranfenicol (15 μg/mL), incubada a 37 °C sob agitação constante até atingir DO_{600nm} = 0,6-0,8. Nessa etapa, acrescentou-se à cultura o indutor Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside - IPTG (Sigma) na concentração final de 1mM. As culturas foram mantidas sob as condições descritas anteriormente por mais 4 horas e centrifugadas por 10 minutos a 8.000 rpm. As células sedimentadas foram ressuspensas em 300 mL de tampão A (100 mM Tris–HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5) e lisozima (50 μg/mL), seguido de incubação em gelo por 1 hora. Após esse período, foi adicionado dodecil sulfato de sódio (SDS) na concentração final de 0,1% e PMSF 1mM (fenilmetanosulfonilfluorido). Em seguida,

foi realizada a lise celular por homogeneização em alta pressão (600 psi por 15 minutos) em homogeneizador modelo APLAB-10 (ARTEPEÇAS, Brasil). O lisado resultante foi centrifugado (10.000 rpm por 1 hora a 4 °C), sendo a fração solúvel (sobrenadante) separada e filtrada com membrana com poros 0,22 μm. A proteína $P1_{39-512}$ foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel em coluna His Trap HP 5 mL (GE, healthcare). O processo de purificação automatizado foi realizado em aparelho AKTA – FPLC (Amersham Pharmacia Biotech). Inicialmente, a coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna de tampão A em um fluxo de 1,0 mL/minuto. Em seguida, o extrato solúvel da linhagem LDV701 foi aplicado à coluna juntamente com 50 mM de Imidazol. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 10 volumes de coluna de tampão A, e iniciou-se a eluição das proteínas adsorvidas à coluna utilizando um gradiente de Imidazol de 100 mM, 500 mM e 1M. Amostras das frações eluidas correspondentes ao pico obtido no cromatograma foram desnaturadas a 100 °C por 5 minutos, e aplicadas em gel de poliacrilamida 12,5%. As amostras correspondentes ao pico que apresentavam a proteína $P1_{39-512}$ foram reunidas, transferidas para membrana de diálise (ThermoScientific, #88244) e dialisadas por um período de 6 horas em tampão A para retirada de Imidazol. A proteína foi quantificada por meio de comparação com bandas de massas pré-estabelecida da proteína soro albumina bovina (BSA) utilizada como padrão. A determinação da concentração foi obtida com o auxílio do software ImageLab (versão 4.1).

3.2.3 Expressão e purificação da proteína LTK63

A expressão e purificação da proteína recombinante LTK63, utilizando a linhagem de *E. coli* BL21 DE03 pLys foram realizadas de acordo com Rodrigues e colaboradores (100). Uma alíquota-estoque foi inoculada em caldo Terrific Broth (TB) contendo ampicilina (100 μg/mL), e incubada a 37 °C sob agitação de 230 rpm em agitador orbital por aproximadamente 18 horas. O inóculo foi preparado a partir dessa cultura, com diluição inicial de 1:100 para 3 L de meio TB distribuídos em 4 erlenmeyers. As culturas foram incubadas a 37 °C sob agitação de 200 rpm por aproximadamente 22 horas. Após esse período de incubação, a culturas foram centrifugadas a 10.000 g por 30 minutos a 4 °C, e resuspensas em 400 mL de tampão TEAN sem sal (Tris-HCl 0,5 M, EDTA 0,01 M, NaN_3 0,03 M, NaCl 2,0 M, pH 7,4) e submetidas à lise celular sob alta pressão (600 psi) por 2 minutos. O lisado obtido foi

centrifugado (10.000 x g por 1 hora 4 °C) e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,22 μm (Millipore).

A proteína LTK63 foi purificada por cromatografia de afinidade em resina Galactose-gel (Pierce, Immobilized D-Galactose Gel). O processo de purificação automatizado foi realizado em aparelho AKTA – FPLC (Pharmacia). O extrato solúvel (500 mL) foi aplicado à coluna pré-equilibrada com 5 volumes de coluna (vc) de tampão TEAN com sal (Tris-HCl 0,5 M, EDTA 0,01 M, NaN_3 0,03 M, NaCl 2,0 M, pH 7,4) em um fluxo de 0,4 mL/minuto. Em seguida, a coluna foi lavada com 5 vc de tampão TEAN com sal para remoção de moléculas não aderidas. A eluição das proteínas adsorvidas à coluna foi iniciada após injeção de 100 % de TEAN com sal acrescido de 0,3 M de D-galactose. A coluna foi regenerada com 5 vc de solução contendo ureia 6 M e 5 vc de água ultrapura. A fração contendo a proteína de interesse foi dialisada e concentrada em filtros Amicon Ultra-15 30.000 MWCO (Millipore) em tampão TEAN com sal para a retirada do eluente D-galactose. A caracterização da proteína quanto à pureza foi avaliada em gel de poliacrilamida a 15 %, e a concentração medida pela absorbância em espectrofotômetro (Gene Quant spectrophotomer GE Amershan Biosciences) conforme descrito anteriormente (101).

3.3 Ensaios de *Western blotting* e Imunodetecção

Para realização dos ensaios de *Western blotting* as amostras proteicas foram submetidas à eletroforese em gel poliacrilamida (12,5 % para a proteína $P1_{39-512}$ e 15 % para a proteína LTK63) e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de PBS-Tween 0,05 % com 3% de leite por 2 horas, a temperatura ambiente. A marcação primária foi realizada por incubação (1 hora e 30 minutos) com anticorpos monoclonais que reconhecem a cauda de histidina (Sigma) presente na proteína recombinante $P1_{39-512,}$ e anticorpos policlonais anti-LT nas diluições 1: 3000, utilizando tampão de bloqueio. Anticorpos anti-IgG de camundongos conjugados com a enzima peroxidase (Sigma) produzidos em camundongos (diluição 1: 3000), foram usados como anticorpos secundários. As reações foram reveladas pela exposição das membranas à solução de Luminol - Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2), de acordo com as indicações do fabricante (THERMO SCIENTIFIC).

3.4 Produção e purificação dos esporos

A esporulação e a purificação dos esporos de *B. subtilis* 1012 foram realizadas conforme protocolo padronizado previamente em nosso laboratório (102). A linhagem bacteriana foi cultivada a 37 °C sob agitação constante por 7 dias em meio específico para esporulação, designado meio F. Suspensões de esporos purificados foram obtidos após tratamento com solução de Tris HCl 50 mM (pH 7,2) contendo lisozima (50 µg/mL) por 1 hora a 37 ºC, seguido de lavagens com SDS 0,05 % e água destilada. A concentração dos esporos foi determinada por plaqueamento em meio LB antes e após tratamento térmico (65 °C por 1 hora) e confirmação por meio da contagem em câmara de Petroff-Hausser (esporos/mL). Por fim, os esporos purificados foram liofilizados e armazenados a -20 ºC.

3.5 Protocolos de imunização

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, entre 6 a 8 semanas de idade, foram adquiridos no Biotério de Isogênicos da Parasitologia-ICBII/USP. Os animais foram mantidos segundo as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os protocolos experimentais utilizando animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade de São Paulo (nº protocolo CEUA: 87/2015).

Para a imunização sublingual, grupos de 5 camundongos BALB/c foram previamente anestesiados por via intramuscular com cloridrato de ketamina (80 mg/kg de peso corporal) e cloridrato de xilazina (8 mg/kg de peso corporal). O regime vacinal consistiu em três doses com intervalo de 14 dias entre as doses, como demonstrado no esquema da Figura 1. Grupos de camundongos foram imunizados com as seguintes formulações: proteína $P1_{39-512}$ administrada na concentração de 5 ou 50 µg, proteína $P1_{39-512}$ coadministrada com diferentes concentrações de esporos (1×10^6, 1×10^8 ou 1×10^9 esporos), proteína $P1_{39-512}$ coadministrada com 5 µg da proteína LTK63 ou a proteína $P1_{39-512}$ coadministrada com ambos os adjuvantes (LTK63 + esporos). Animais controles foram imunizados com o veículo vacinal, solução PBS. As doses vacinais foram administradas no volume de 10 µL por aplicação tópica embaixo da língua com o auxílio de micropipeta. Os protocolos de imunização foram realizados de acordo com o

delineamento experimental de cada ensaio e serão especificados nas seções dos resultados.

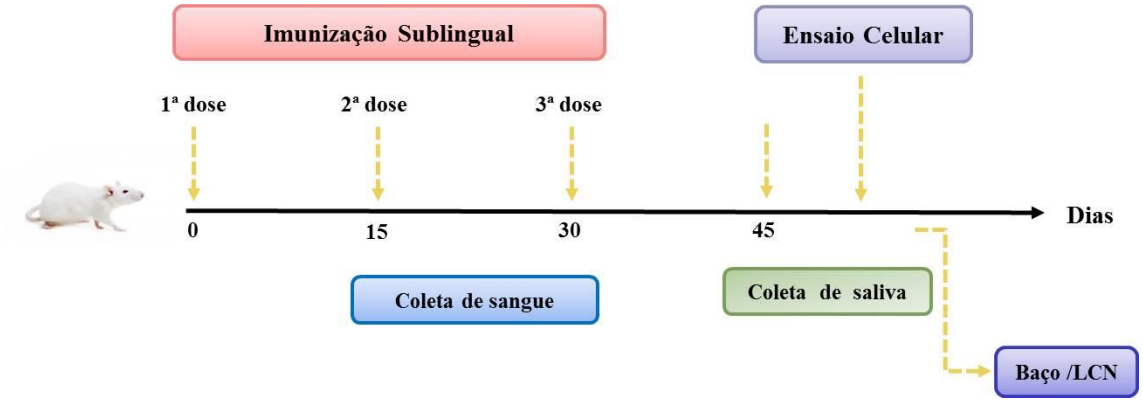

Figura 3 - Representação esquemática do regime vacinal empregado. Camundongos BALB/c fêmeas foram submetidos a um regime de imunização sublingual de três doses com intervalos de 14 dias entre as doses. Amostras de sangue foram coletadas duas semanas após cada dose para obtenção dos soros e análise da resposta humoral específica. Três semanas após a última dose, amostras de saliva foram coletadas para avaliação da resposta de anticorpos IgA secretores. Para avaliação das respostas celulares induzidas após regime vacinal, grupos de animais foram eutanaziados três semanas após a ultima dose e tiveram seus baços e linfonodos cervicais (LNC) retirados para dosagem de citocinas e determinação do número de células secretoras de IgA-específica.

3.6 Coleta e processamento de amostras

Para o monitoramento das respostas de anticorpos séricos contra o antígeno vacinal foram coletadas amostras de sangue um dia antes de cada dose e duas semanas após a última dose, por punção no plexo submandibular dos animais. Para obtenção do soro, o sangue coletado foi mantido à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, a 4 ºC por mais 30 minutos para retração do coágulo. Após centrifugação refrigerada, 5.000 rpm por 30 minutos, os sobrenadantes foram separados. As respostas de anticorpos antígeno-específico presentes no sítio da mucosa oral foram avaliadas a partir de amostras de saliva coletadas duas semanas após a última dose vacinal. A saliva foi recolhida após a administração oral de (5-20 µL) pilocarpina a 4% na cavidade oral dos animais, conforme protocolo descrito previamente (103). Todas as amostras foram armazenadas à - 20 ºC até sua utilização.

3.7 ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Placas de poliestireno de 96 poços (COSTAR-CORNING) foram sensibilizadas por 18 horas a 4 ºC com a proteína recombinante $P1_{39-512}$ em solução PBS (200 ng/

μL). As placas foram lavadas com solução PBS 1x contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e bloqueadas com PBST contendo 3% de leite desnatado. Após incubação por 2 horas a 37 °C, as placas foram lavadas (3 x) e as amostras de soro ou saliva foram adicionadas aos poços, diluídas serialmente (1:2) em solução de bloqueio, e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram novamente lavadas (3 x) e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com anticorpos monoclonais anti-IgG ou anti-IgA conjugados à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:3000 em solução de bloqueio. Para a determinação das subclasses de IgG, foram empregados anticorpos anti- IgG1 e IgG2a conjugado à peroxidase. Após a lavagem final, as placas foram reveladas com solução contendo tampão citrato-fosfato 33 mM, pH 5, *o*-Phenylenediamine(OPD); e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)] por 15 minutos à temperatura ambiente e no escuro. A reação foi interrompida pela adição de H_2SO_4. A leitura da densidade óptica foi realizada a 492 nm em leitor de placa (Multiscan MS-Labsystems). Os níveis de anticorpos IgG específicos para a proteína $P1_{39-512}$ foram apresentados na forma de títulos, considerando o valor de diluição em que a DO_{492} nm fosse igual ou superior 0,1.

3.8 Análise da afinidade dos anticorpos $P1_{39-512}$ específicos

Para esse ensaio foram utilizadas amostras de soros combinadas (*pool*) referentes à terceira dose de imunização de cada grupo vacinal. Todas as amostras de soro foram normalizadas para uma $D.O_{600nm}$ de 1,0. O ensaio de afinidade dos anticorpos seguiu os procedimentos descritos para ELISA (item 3.7), com uma etapa adicional de dissociação dos anticorpos anti-$P1_{39-512}$ por incubação com diferentes concentrações molar de tiocianato de amônio diluído em PBS (0.0 M, 0.125 M, 0.15 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.5 M, 1 M, 2 M, 4 M ou 8 M) por 15 minutos à temperatura ambiente. A percentagem de ligação dos anticorpos ao antígeno $P1_{39-512}$ correspondente à cada concentração de tiocianato de amônio testada foi determinada da seguinte forma: $D.O_{490nm}$ em presença de tiocianato de amônio X 100/ $D.O_{490nm}$ em ausência de tiocianato de amônio. A concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar 50% da ligação do anticorpo ao antígeno foi determinada por cálculo utilizando método de regressão linear.

3.9 Análise da ligação de anticorpos à superfície de *S. mutans*

Os soros obtidos após a terceira dose de imunização foram avaliados quanto à capacidade de reconhecer a proteína nativa expressa por diferentes sorotipos de *S. mutans* por ensaio de ELISA. As cepas de *S. mutans* UA159 (sorotipo c), B14 (sorotipo e) e OMZ175 (sorotipo f) utilizadas no ensaio foram gentilmente cedidas pela professora Dra. Maria Regina L. Simionato e cultivadas em meio Todd-Hewitt com 0,3 % de extrato de levedura (THY) a 37 ºC em presença de 5% de CO_2. As culturas foram centrifugadas a 8000 rpm por 5 minutos, lavadas duas vezes em solução PBS 1x e ajustadas para a $D.O_{600nm}$ de 1. Em seguida, 100 µL de cada suspenção bacteriana foram adicionados em placas de poliestireno de 96 poços (COSTAR-CORNING) e incubadas por 16 horas a 4 °C. Os procedimentos do ensaio foram os mesmos que os descritos na seção 3.7. A reatividade dos soros foi testada utilizando anticorpos anti-IgG de camundongos produzidos em cabra conjugados com a enzima peroxidase (Sigma) diluído 1: 5000. O valor da absorbância do soro do grupo controle imunizado com PBS foi utilizado como referência de branco.

3.10 Obtenção e processamento de esplenócitos e linfonodos cervicais

Três semanas após a última dose vacinal, os animais foram submetidos à eutanásia e seus baços e linfonodos cervicais (LNC) foram removidos assepticamente e transferidos para placas de Petri contendo meio RPMI 1640 (Vitrocell/Embriolife) suplementado com 1% de soro fetal bovino. Os baços foram macerados individualmente com auxílio do êmbolo de uma seringa de 5 mL e as células dos LNCs foram reunidas em “pool” de acordo com cada grupo experimental e processadas da mesma forma. As células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos. Os esplenócitos foram tratados com solução de acetato de potássio (1 mL/baço) para a lise das hemácias. Após esse procedimento, as suspenções foram novamente centrifugadas e o sedimento celular suspenso em meio RPMI suplementado [meio RPMI contendo soro fetal bovino (10%), beta-mercaptoetanol (100 x), aminoácidos essenciais (50 x), aminoácidos não essenciais (100 x), L-glutamina (100 x), vitaminas (100 x) e piruvato(100 x)]. As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando o corante vital azul de Trypan (Invitrogen).

3.11 Ensaio de ELISPOT

Células do baço e linfonodos cervicais foram submetidas ao ensaio de ELISPOT para a quantificação de células produtoras de IgA, utilizando-se o kit comercial ELISpot^{PLUS} for Mouse IgA (MABTECH®). Para isso, placas de 96 poços foram ativadas por 2 minutos com Etanol 70%, em seguida, foram lavadas com água destilada estéril, sensibilizadas com a proteína $P1_{39-512}$ (10 μg/mL) e incubadas a 4 °C por 24 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 1 x e bloqueadas com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 30 minutos à temperatura ambiente. Foram plaqueadas 10^6 células/poço em presença ou ausência de estimulo ($P1_{39-512}$ 1 μg/poço). Como controle positivo e negativo deste ensaio, foram utilizados Concavalina A e meio RPMI completo, respectivamente. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C e 5% de CO_2. Após esse período, as células foram descartadas e as placas foram lavadas 5 x com PBS 1x e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo monoclonal biotinilado anti- IgA na concentração final de 1 μg/mL diluídos em PBS 1x contendo 0,5% de SFB. Após novo ciclo de lavagem, as placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com estreptavidina conjugada com peroxidase diluída 1: 1000 em PBS 1x contendo 0,5 % de SBF. As placas foram reveladas adicionando-se 100 μL/ poço do substrato TMB presente no Kit. Após 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida com água destilada, as placas foram secas à temperatura ambiente e os “spots” contados com auxílio de uma lupa.

3.12 Avaliação do perfil de secreção de citocinas

As dosagens de citocinas no sobrenadante de cultura de células do baço e LNCs dos grupos experimentais foram realizadas pelo método CBA (*Cytometric Bead Array*). As células foram cultivadas em uma concentração de 10^6 células/poço por 48 horas a 37 ºC em placa de fundo plano em 500 μL de meio RPMI completo, na presença ou não da proteína $P1_{39-512}$ na concentração de 10 μg/mL. Após 72 horas de incubação, o sobrenadante foi coletado e armazenado em curto prazo a -20 °C. As citocinas IL-6, INF-γ, IL-10 e IL-17 foram quantificadas utilizando o kit comercial BD^{TM}Cytometric Bead Array Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (CBA). As fluorescências foram

avaliadas em citometria de fluxo LSRFortessa™ (BD Bioscience) e concentração das citocinas (pg/mL) foram determinadas utilizando o Software BD CBA.

3.13 Determinação das respostas de linfócitos TCD4$^+$ e TCD8$^+$

As células do baço dos animais imunizados foram cultivadas em meio RPMI completo na concentração de 10^6 células/poço em placas de fundo côncavo. A incubação ocorreu por 16 horas a 37 ºC e 5% CO_2, na presença de Brefeldin A (10 µg/mL) (GolgiPlug; BD Bioscience, EUA), IL-2 (5 ng/mL) e ausência ou presença da proteína recombinante. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1200 *x g* por 5 minutos e lavadas duas vezes com PBS 1x contendo 2 mM de EDTA/0,5% de BSA. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 acoplados aos fluorocromos FITC e BV605, respectivamente (eBioscience®). Para marcação das citocinas intracelulares foi utilizado o kit Cytofix/Cytosperm Plus (BD Biosciences, USA). As células foram lavadas, suspensas em 50 µL de solução de fixação (BD, Cytofix/Cytoperm™), mantidas a 4 °C por 10 minutos e permeabilizadas com 100 µL de solução Perm/Wash. As células foram novamente lavadas e tratadas com anticorpo anti-IFN-γ conjugado a Alexa 700 e anti-IL-4 conjugado a PE (BD Bioscience) por 30 minutos a 4 °C. Após as lavagens, as células foram suspendidas em PBS 1x contendo 2 mM de EDTA/0,5% de BSA e avaliadas por citometria de fluxo usando o aparelho FACS LSRFortessa (BD Biosciences). A análise dos dados foi realizada com o auxílio do software FlowJo (TreeStar,OR, USA).

3.14 Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, LA Jolla, CA) utilizando análise de variância (Anova) com subsequente teste de comparação múltipla de Bonferroni. A significância estatística entre os grupos experimentais foi considerada quando $p < 0,05$, $p < 0,01$ ou $p < 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes $P1_{39-512}$ e LTK63

A proteína recombinante $P1_{39-512}$ foi obtida em linhagem de *B. subtilis* LDV701 após indução com IPTG por 4 horas a 37 °C. A purificação da proteína $P1_{39-512}$ foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel a partir do extrato solúvel da cultura induzida. Como é possível observar na Figura 4A, a eluição da proteína utilizando a concentração de 500 mM de Imidazol resultou na formação de um único pico contendo a $P1_{39-512}$ purificada. As frações correspondentes ao pico representado no cromatograma de eluição da proteína $P1_{39-512}$ foram avaliadas em gel poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% (Figura 4B). A proteína purificada apresentou perfil eletroforético com massa molecular esperada de 50 kDa, sendo esta observação confirmada por ensaio de *western blot* e imunodetecção utilizando anticorpos monoclonais dirigidos para a cauda de histidina presente na proteína recombinante $P1_{39-512}$ (Figura 4C). As frações contendo a proteína $P1_{39-512}$ purificada foram reunidas e dialisadas contra tampão A, para retirada do Imidazol. Após diálise, as proteínas foram quantificadas e armazenadas a temperatura de -20 °C. Em suma, o processo de purificação possibilitou obter a proteína recombinante de forma eficiente, com elevado grau de pureza e com rendimento aproximado de 3 mg de proteína por litro de cultura bacteriana induzida.

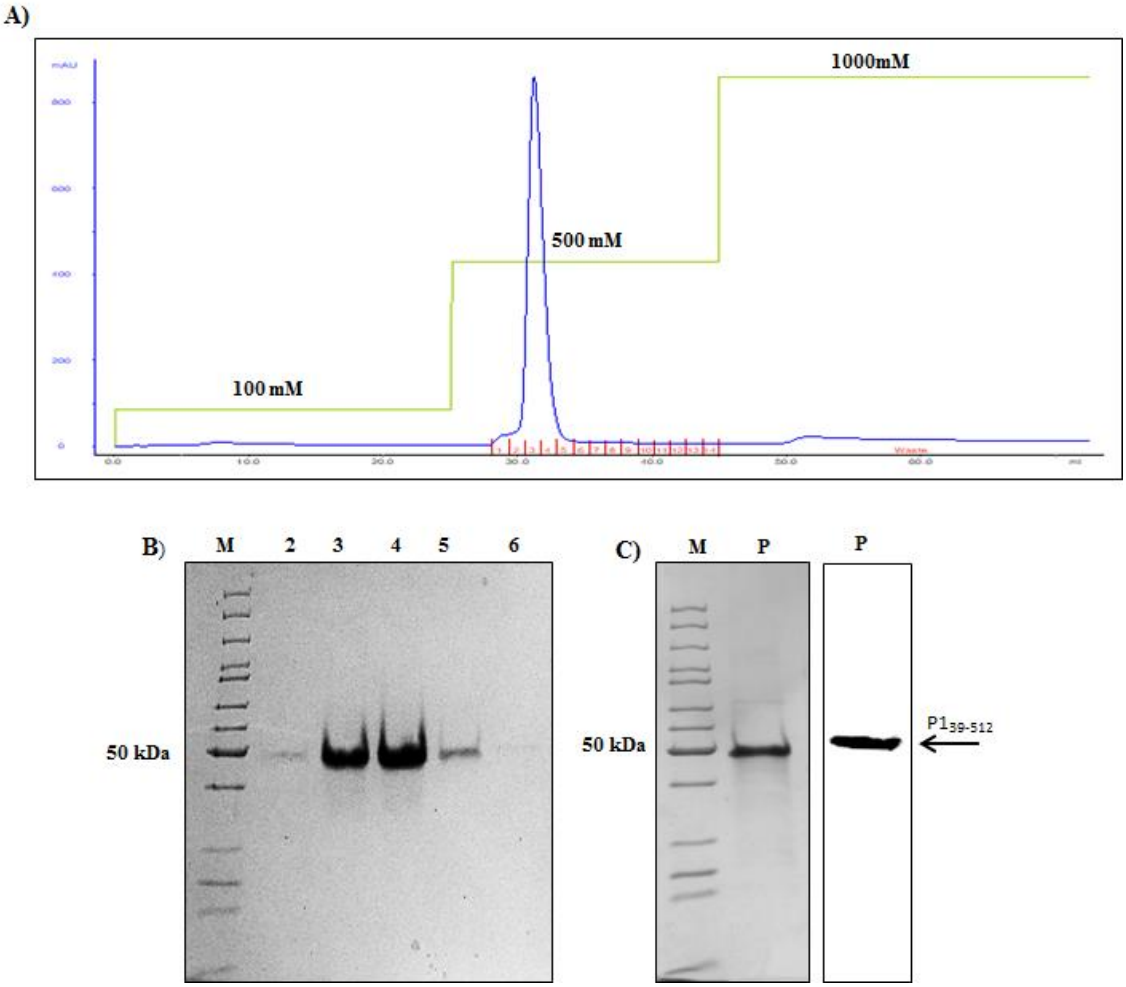

Figura 4 - Purificação da proteína recombinante $P1_{39-512}$ expressa em *B. subtilis*. **(A)** Cromatograma representativo da purificação da proteína $P1_{39-512}$ em coluna niquelada, utilizando concentrações de 100 mM, 500 mM e 1 M de Imidazol. (B) Gel de poliacrilamidaa 12,5 %, apresentando as frações obtidas no cromatograma. Gel corado com Coomassie Blue. Descrição: canaleta M, corresponde ao marcador de massa molecular de proteína (Fermentas); demais canaletas (2-6) correspondem as frações do pico de eluição da proteína $P1_{39-512}$ (50 kDa). (C) Imunodetecção após *Western blot* da proteína $P1_{39-512}$ utilizando anticorpo monoclonal anti-HisTag.

A proteína recombinante LTK63 foi obtida em linhagem de *E. coli* BL21 DE03 pLys recombinante após indução constitutiva por 22 horas a 37 °C. A proteína LTK63 foi purificada por cromatografia de afinidade à galactose (Figura 5). A integridade e a pureza da proteína após purificação foi confirmada em gel de poliacrilamida 15%. A análise eletroforética demonstrou grau de pureza elevada e bandas com massa molecular esperada para cada uma das subunidades da proteína. Quando a amostra foi submetida ao processo de fervura, foi possível verificar bandas eletroforéticas correspondentes à subunidade A (28 kDa) e aos monômero de subunidade B (11,5 kDa). A amostra não submetida ao tratamento térmico demonstrou banda correspondente à subunidade A e à subunidade B em sua estrutura pentâmerica (55 kDa) (Figura 5B). O rendimento obtido

foi de aproximadamente 10 mg de proteína por litro de cultura induzido. Além disso, verificamos que a proteína LTK63 foi reconhecida por anticorpos policlonais produzidos contra a toxina termolábil LT1 em ensaio de imunodetecção (Figura 5C).

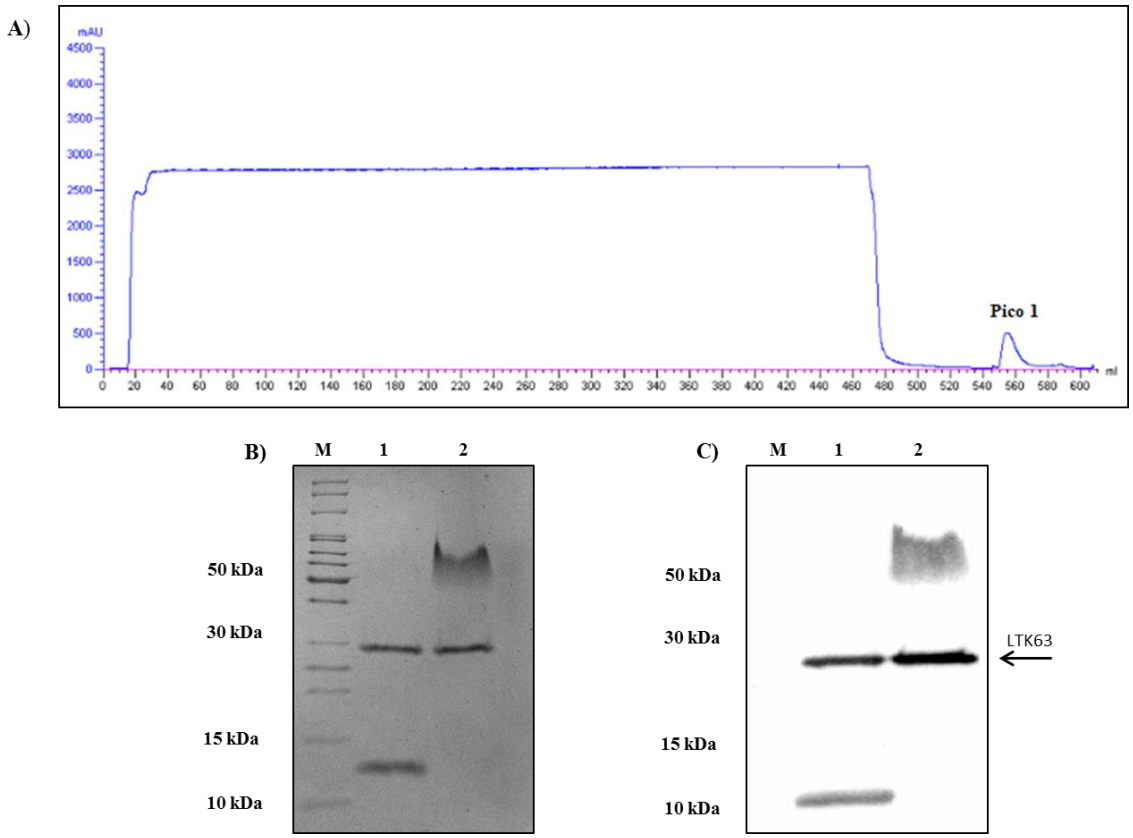

Figura 5 - Purificação da proteína recombinante LTK63 expressa em *E. coli*. Cromatograma representativo da purificação da proteína LTK63 em coluna contendo resina D-galactose. Pico 01 representa a proteína eluída com 100% de tampão TEAN acrescido de D-galactose 0,3 M. (B) Gel de poliacrilamidaa 15%, apresentando a proteína LTK63 purificada. Gel corado com Coomassie Blue. Descrição: canaleta M, corresponde ao marcador de massa molecular de proteína (Fermentas); Amostras: canaleta 1, proteína LTK63 fervida a 100 °C (subunidade A com 28 kDa e monômeros de subunidade B com 11,5 kDa); canaleta 2, proteína LTK63 não fervida (subunidade A e pentâmero de subunidade B com 55 kDa); (C) Imunodetecção após *Western blot* da proteína LTK63 fervida e não fervida realizado com anticorpo policlonal anti-LT1.

4.2 Obtenção de esporos de *B. subtilis* purificados

Os esporos foram obtidos após o cultivo de *B. subtilis* linhagem 1012 em meio F durante um período de 7 dias. Ao final desse período, os esporos foram purificados pelo método lisozima-SDS e o precipitado lavado (3 x) com água destilada para rompimento de possíveis células vegetativas. Após este processo, amostras de esporos foram analisadas por meio de microscopia de contraste de fase, onde foi possível observar que as preparações de esporos estavam livres de contaminação por células vegetativas e fragmentos celulares (Figura 6). A quantificação dos esporos foi realizada por meio da determinação do número de UFC/mL e confirmada por contagem na câmara de Petroff-Hausser (esporos/mL)**.**

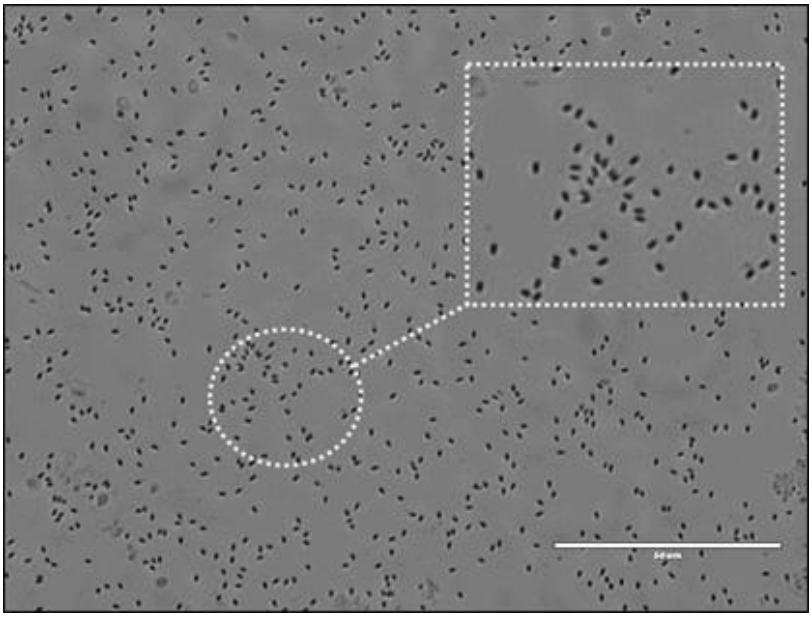

Figura 6 - Microscopia de contraste de fase dos esporos de *B. subtilis* da linhagem 1012 após processo de purificação**.** Os esporos foram obtidos a partir do cultivo da bactéria em meio F durante 7 dias e purificados por meio do método lisozima/SDS. Resolução final de 600x.

4.3 Caracterização do potencial adjuvante dos esporos de *B. subtilis*

Para explorar a utilização de esporos de *B. subtilis* como adjuvante de mucosa, a primeira etapa do trabalho consistiu em determinar a concentração de esporos capaz de potencializar a resposta de anticorpos contra o antígeno alvo. Para isso, grupos de cinco

camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 6 e 8 semanas foram imunizados pela via sublingual em um regime de três doses conforme mostrado no esquema da Figura 3. Foram testadas as concentrações de 1 x 10^6, 1 x 10^8 ou 1 x 10^9 esporos coadministrados com 5 µg da proteína recombinante $P1_{39-512}$. Amostras de sangue foram coletadas duas semanas após cada dose vacinal e as respostas de anticorpos IgG séricos específicos para a proteína $P1_{39-512}$ foram determinadas por ensaio de ELISA (Figura 7). Os resultados demonstram que a proteína $P1_{39-512}$ sozinha não foi imunogênica quando administrada pela via sublingual, uma vez que respostas de anticorpos específicos não foram detectadas ao longo do regime vacinal. A indução de anticorpos anti-$P1_{39-512}$ foi observada somente após a terceira dose de imunização para os grupos tratados com a proteína $P1_{39-512}$ coadministrada com as diferentes concentrações de esporos. Embora não tenha sido observada diferença estatística entre as concentrações de esporos utilizadas no regime vacinal, observamos que os maiores títulos de anticorpos foram alcançados quando utilizamos 1 x 10^6 esporos coadministrados com o antígeno, tornando-se a dose de escolha para a realização dos demais experimentos.

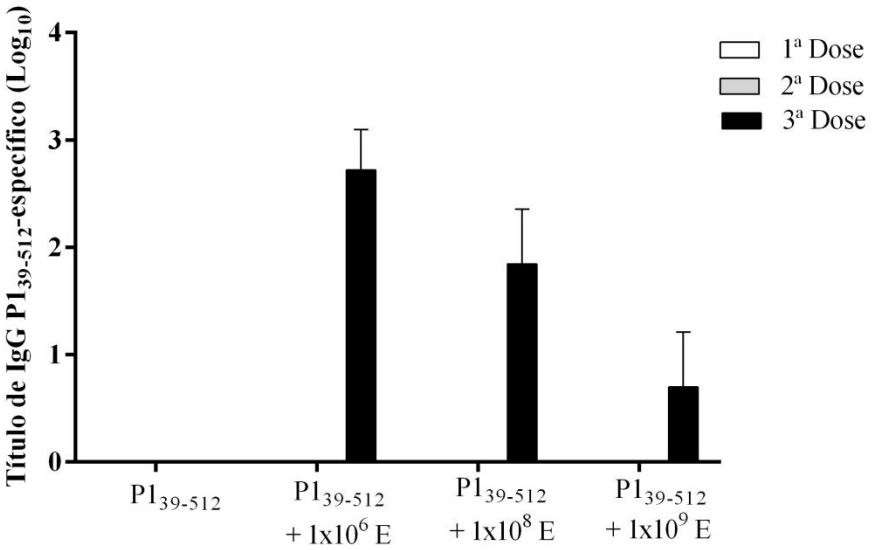

Figura 7 - Avaliação do efeito adjuvante dos esporos de B. subtilis coadministrados com a proteína $P1_{39-512}$**.** Camundongos da linhagem BALB/c fêmeas foram imunizadas com formulações vacinais contendo a $P1_{39-512}$ sozinha (5 µg) ou coadministrada com 1 x 10^6, 1 x 10^8 ou 1 x 10^9 esporos (E) em um regime vacinal de três doses por via sublingual. Os títulos de anticorpos IgG $P1_{39-512}$-específicos foram determinados por ELISA utilizando amostras de soro obtidas 14 dias após a administração de cada dose. Os valores apresentado no gráfico representam a média ± desvio padrão dos títulos de anticorpos séricos referente a um único ensaio com amostras individuais medidas em duplicata. Os dados mostrados não apresentam diferenças estatísticas entre si.

4.4 Caracterização da resposta imune humoral nos animais imunizados

Após a determinação da concentração de esporos a ser utilizada na formulação vacinal, novas imunizações foram realizadas. Nesta etapa passamos a avaliar a resposta imunológica humoral induzida pela proteína coadministrada com o adjuvante LTK63 ou em combinação com os dois adjuvantes (esporos + LTK63). O regime vacinal consistiu na administração de três doses com intervalos de 14 dias entre as doses conforme protocolo anterior. Os dados demonstram que quando a proteína é coadministrada com o adjuvante LTK63, há um aumento significativo dos títulos de anticorpos IgG específicos para a proteína $P1_{39-512}$ quando comparado ao grupo imunizado com a proteína coadministrada com os esporos. Além disso, observa-se que os níveis de anticorpos específicos anti-$P1_{39-512}$ foram detectados a partir da primeira dose de imunização, aumentando gradativamente ao longo do regime vacinal. Os títulos de anticorpos obtidos para o grupo imunizado com a proteína coadministrada com esporos + LTK63 foram semelhantes aos títulos de anticorpos encontrados para o grupo imunizado com a proteína coadministrada apenas com a LTK63 (Figura 8A). Esses resultados indicam que a combinação dos adjuvantes, avaliados após imunização pela via sublingual, não demostrou sinergismo ou efeito aditivo sobre a modulação da resposta humoral de anticorpos IgG direcionados para o antígeno $P1_{39-512}$.

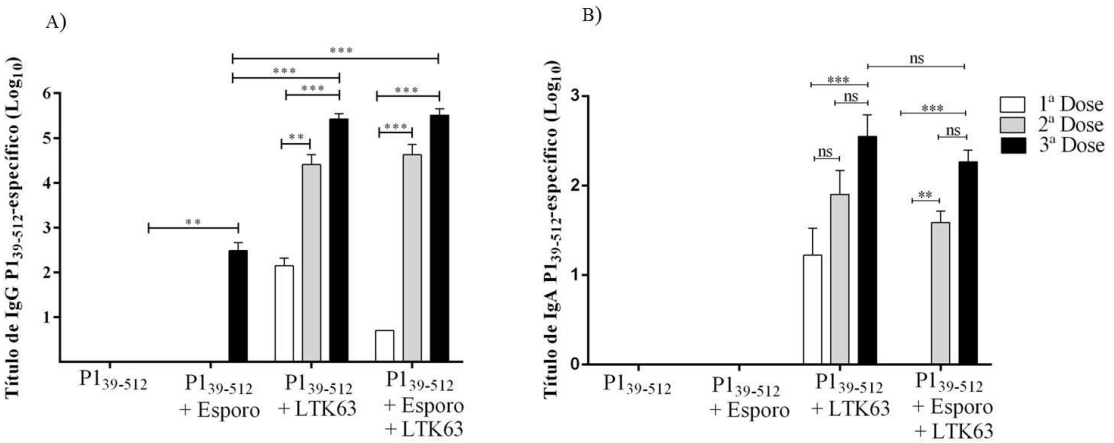

Figura 8 - Análise da resposta de anticorpos séricos $P1_{39-512}$-específicos induzidos após regime vacinal. Camundongos da linhagem BALB/c fêmeas foram imunizadas com três doses por via sublingual com formulações vacinais contendo a proteína $P1_{39-512}$ (5 µg), $P1_{39-512}$ coadministrada com esporos de *B. subtilis* (1 x 10^6) e/ou coadminstrada com LTK63 (5 µg). Os títulos de IgG **(A)** e IgA **(B)** séricos anti-$P1_{39-512}$ foram determinados por ELISA utilizando amostras de soro obtidas 14 dias após a administração de cada dose. Os valores apresentados nos gráficos representam a média ± erro padrão dos títulos de anticorpos séricos referentes a três experimentos independentes.*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (Two-way ANOVA com pós-test Bonferroni's).

O trabalho procurou avaliar também o efeito adjuvante dos esporos e da proteína LTK63 em relação à produção de anticorpos IgA séricos ou em saliva. Os resultados apresentados mostram que os grupos de animais imunizados apenas com a proteína $P1_{39-512}$ ou aqueles que receberam a formulação contendo a proteína $P1_{39-512}$ coadministrada com os esporos não foram capazes de gerar resposta de anticorpos IgA séricos ou secretores específicos para a proteína $P1_{39-512}$ (Figura 8B e Figura 9). Em contrapartida, os grupos tratados com as formulações contendo a proteína coadministrada com a LTK63 ou combinada com ambos adjuvantes apresentaram tanto respostas de anticorpos IgA séricos quanto em saliva. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos títulos dos anticorpos IgA (sistêmicos e secretores) entre esses grupos vacinais. Esses dados, em conjunto com as respostas de anticorpos IgG sistêmicos, demonstram que a modulação da reposta humoral e de mucosa refletem o efeito adjuvante da LTK63.

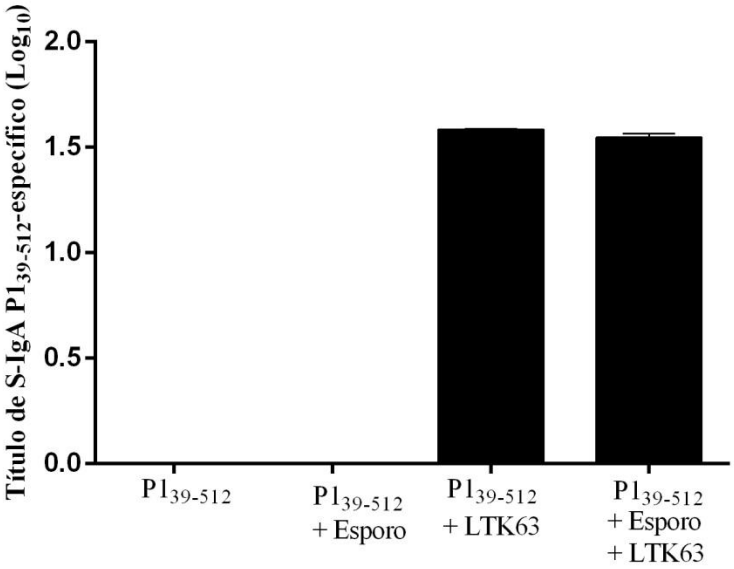

Figura 9 - Análise da resposta de anticorpos IgA secretores induzidos após regime vacinal. Duas semanas após a última dose vacinal, amostras de saliva foram coletadas para a determinação das respostas de anticorpos S-IgA específicos para a proteína $P1_{39-512}$. Os valores apresentados nos gráficos representam a média ± erro padrão dos títulos de anticorpos específicos referentes a dois experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001(Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.5 Análise do perfil de subclasses de IgG no soro de animais imunizados

Com o objetivo de avaliar o perfil das respostas imunológicas induzidas pelas formulações vacinais, analisamos as subclasses de anticorpos IgG anti-$P1_{39-512}$ nos soros

dos animais duas semanas após a última dose de imunização. Os soros foram avaliados quanto à presença de IgG1 e IgG2a como indicativo do perfil de resposta Th2 ou Th1, respectivamente. Anticorpos das duas subclasses de IgG foram detectadas nos soros dos grupos imunizados com a proteína coadministrada com esporos e/ou LTK63 (Figura 10). Observamos que a resposta induzida pela coadministração dos esporos tendência para um perfil Th2, e que a coadministração da LTK63 além de aumentar os títulos das subclasses de IgG leva a uma distribuição mais balanceada dos isotipos IgG1 e IgG2a. As razões entre os títulos de anticorpos das subclasses IgG1/IgG2a apresentadas na parte superior do gráfico sugerem um padrão de resposta mista Th1/Th2 para os grupos imunizados com o adjuvante LTK63.

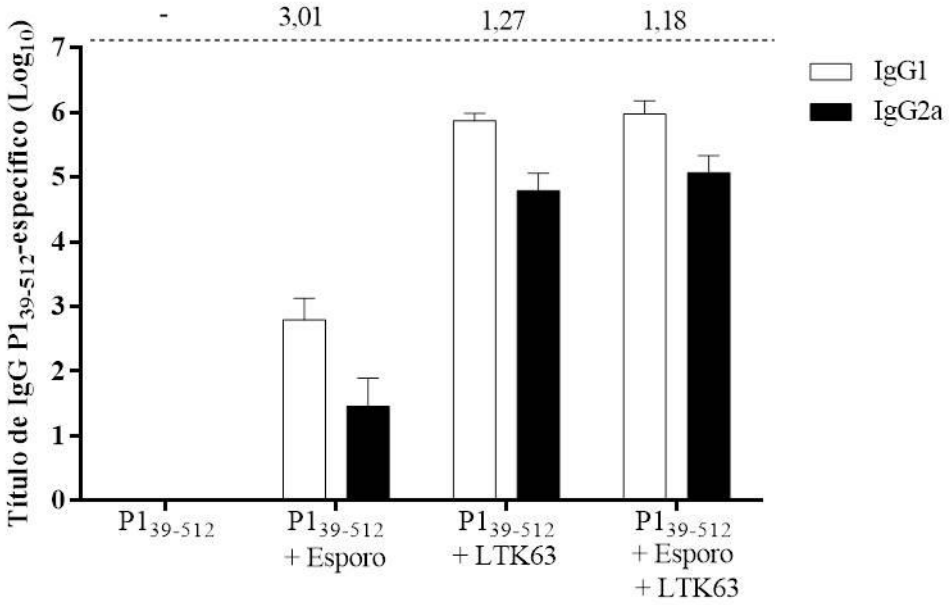

Figura 10 - Análise do perfil de subclasses de anticorpos IgG P1$_{39-512}$-específicos induzidos nos animais imunizados. Os títulos de subclasses de anticorpos IgG (IgG1, IgG2a) P1$_{39-512}$-específicos foram quantificados em amostras de soro obtidas após a terceira dose de imunização por ensaio de ELISA. Ausência de barra corresponde a valores não detectáveis de anticorpos nos grupos vacinais. Dados na parte superior do gráfico indicam a razão entre IgG1 e IgG2a para cada grupo de imunização. Os valores apresentados no gráfico representam a média ± erro padrão dos títulos de subclasses de IgG em amostras individuais referente a três experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.6 Determinação do perfil de secreção de citocinas

Para confirmar os dados obtidos em relação ao padrão de resposta induzida pelas formulações vacinais foram determinados os níveis das citocinas produzidas e secretadas por esplenócitos e células dos linfonodos cervicais dos animais imunizados. O baço e os linfonodos foram coletados três semanas após a última dose vacinal e as células recolhidas foram estimuladas *in vitro* com a proteína P1$_{39-512}$ por 72 horas. Após

incubação, o sobrenadante foi separado e utilizado para detecção das citocinas IFN-γ, IL-6, IL-10 e IL-17 por ensaio de CBA (Figura 11). Podemos observar que os animais tratados com as formulações contendo apenas a proteína $P1_{39-512}$ produziram baixos níveis das citocinas avaliadas nos esplenócitos estimulados. Além disso, não foram detectados níveis da citocina IL-6. Por outro lado, nos animais submetidos às imunizações contendo tanto os esporos como a LTK63 foi possível demonstrar a potencialização e/ou a modulação das respostas celulares do hospedeiro contra a proteína $P1_{39-512}$. Para os animais tratados com proteína e esporos, podemos observar que houve maior produção de citocina do tipo Th2 (IL-6) e menores níveis de citocina do tipo Th1 (IFN-γ). Não foram observados níveis detectáveis da citocina regulatória IL-10. Curiosamente baixos níveis da citocina IL-17 (perfil Th17) foram encontrados para esse grupo quando comparado com a produção de IL-17 nos animais imunizados apenas com proteína recombinante. Desta forma podemos constatar que a administração dos esporos modula o perfil de resposta anti-$P1_{39-512}$ preferencialmente para uma resposta Th2. Já os grupos imunizados com a formulação contendo a LTK63 apresentaram níveis aumentados de IFN-γ e IL-6, confirmando que a modulação induzida por esse adjuvante promove um perfil de resposta mais balanceado. Verificamos ainda que os grupos imunizados com a formulação contendo a LTK63 apresentaram níveis mais elevados da citocina IL-17, o que corrobora com os dados da literatura que demonstram que a toxina LT em ensaios *in vitro* e *in vivo* é capaz de induzir a produção de citocinas IL-17 por DCs ativadas (104). Em relação ao grupo imunizado com a $P1_{39-512}$ e a combinação dos dois adjuvantes foi possível observar aumento na produção das citocinas analisadas, com exceção de IL-17, demonstrando desta maneira que a presença dos esporos na formulação vacinal modula negativamente a expressão desta citocina e gera um perfil preferencialmente Th1. Os resultados obtidos a partir do sobrenadante da cultura dos linfonodos cervicais não foram conclusivos quanto ao padrão de resposta induzido pelos adjuvantes, e por este motivo não foram apresentados.

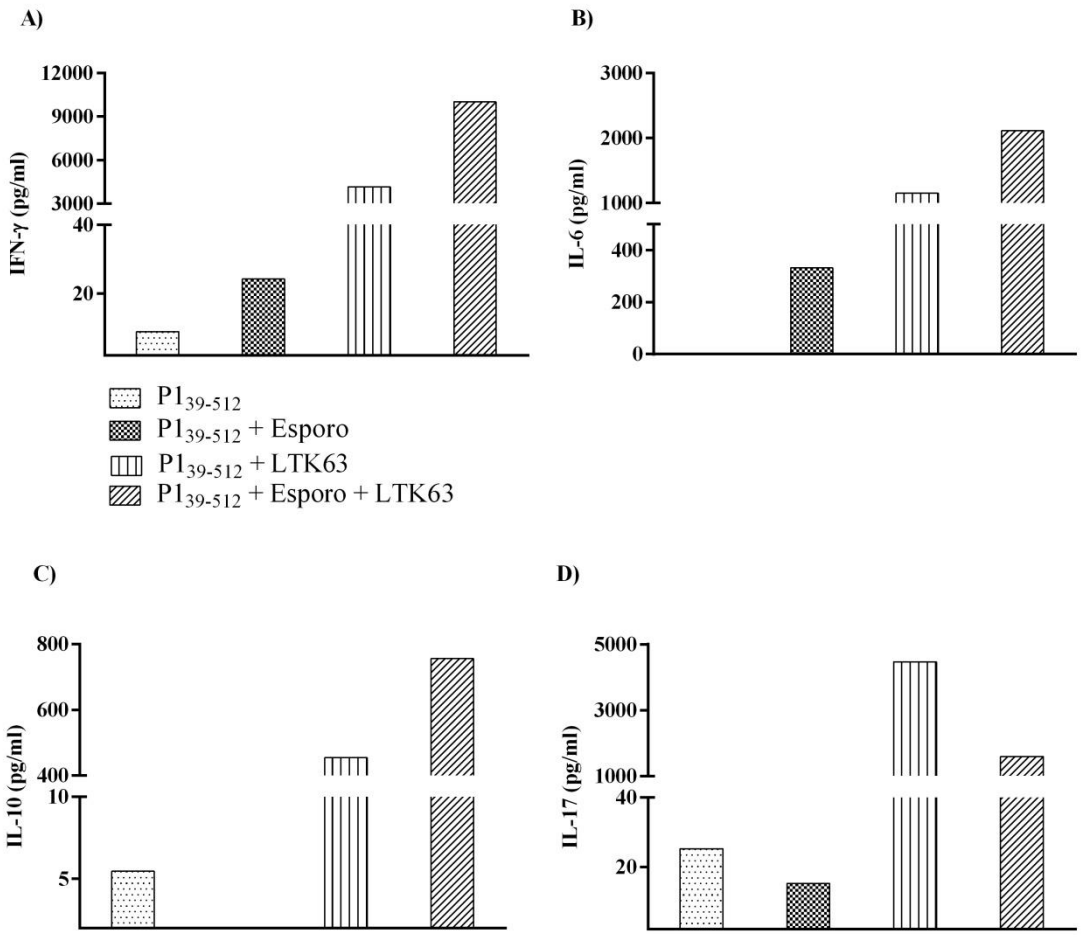

Figura 11 - Perfil de secreção de citocinas após imunização sublingual com a $P1_{39-512}$ e adjuvantes. Os níveis das citocinas IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-17 foram determinados três semanas após a última dose da vacina em sobrenadante da cultura de esplenócitos reestimulados in vitro com 1 µg da proteína $P1_{39-512}$ purificada. Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 72 horas de contato com o estímulo e submetidos ao ensaio de CBA (*Cytometric Beads Assay*) e citometria de fluxo.

4.7 Determinação do número de células secretoras de anticorpos IgA $P1_{39-512}$ específicas

Avaliamos a presença de células secretoras de anticorpos (CSA) IgA antígeno-específicas nos baços e linfonodos cervicais (LNC) dos animais imunizados três semanas após a última dose vacinal (Figura 12). Nas condições de imunização e experimentação realizadas, não foi possível observar presença de células secretoras de IgA antígeno específicas nos LNCs. Os resultados demonstram que o grupo imunizado com a proteína ou proteína coadministrada com esporos apresentaram baixos níveis de CSA-IgA antígeno-específicas no baço. Por outro lado, o grupo imunizado com a proteína coadministrada com o adjuvante LTK63 foi capaz de induzir níveis de CSA-IgA antígeno-específicas superiores aos demais grupos vacinais ($p<0,001$).

Curiosamente, a formulação contendo a combinação de ambos adjuvantes não apresentou aumento expressivo no número dessas células, sugerindo que os esporos suprimem esse tipo de resposta.

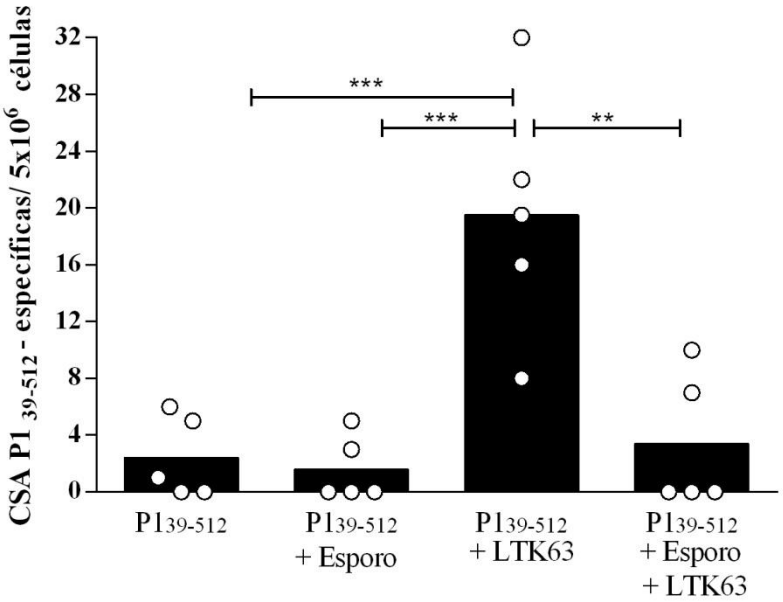

Figura 12 - Células secretoras de anticorpos IgA $P1_{39-512}$-específicas. A presença de células secretoras de IgA antígeno-específicas foi determinada três semanas após a última dose de imunização em células de baço por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram incubados por 24 horas em presença ou ausência da proteína recombinante $P1_{39-512}$ (5 µg de $P1_{39-512}$). O gráfico apresenta o número de células produtoras de IgA por milhão de células totais descontando-se o número de spots formados na ausência de estímulo. Os resultados são baseados em um único experimento e representam as médias para cada grupo vacinal.*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (One-way ANOVA com pos-testBonferroni's).

4.8 Análise da resposta qualitativa humoral $P1_{39-512}$ específica

4.8.1 Determinação do perfil de reconhecimento de epítopos conformacionais e lineares pelos anticorpos $P1_{39-512}$

Após a avaliação da resposta de anticorpos séricos induzidos pela imunização dos camundongos com a proteína $P1_{39-512}$ associada aos adjuvantes vacinais, a seguinte etapa do trabalho consistiu em caracterizar qualitativamente a resposta desses anticorpos. Para este fim, os anticorpos foram testados quanto ao reconhecimento de epítopos conformacionais ou lineares presentes na proteína recombinante. A análise foi realizada por ensaio de ELISA empregando a proteína recombinante $P1_{39-512}$ em sua forma intacta ou previamente submetida ao tratamento de desnaturação térmica (aquecimento a 100 °C por 10 minutos). Observando a Figura 13, podemos perceber que a resposta dos anticorpos induzidos contra a proteína é direcionada principalmente para os epítopos lineares, visto que não houve diferença de reatividade quando a proteína foi utilizada em sua forma intacta ou após tratamento térmico.

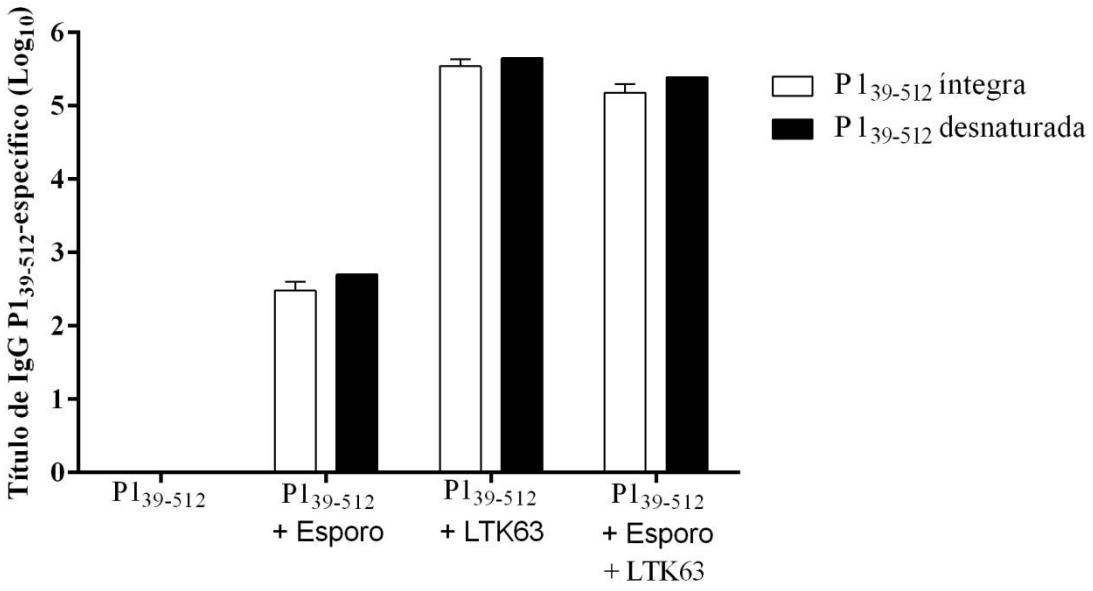

Figura 13- Avaliação da capacidade dos anticorpos P1$_{39-512}$-específicos se ligarem a epítopos conformacionais e lineares. Os anticorpos IgG P1$_{39-512}$-específicos presentes nos soros dos animais imunizados foram testados por ELISA quanto à sua reatividade com a proteína P1$_{39-512}$ recombinante em sua forma íntegra ou submetida à desnaturação (aquecimento a 100 °C por 10 minutos, seguido de choque térmico a 0 °C). As amostras de soros, correspondentes à última dose vacinal, foram reunidas em pools. Os resultados expressos são representativos de dois experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.8.2 Determinação da afinidade dos anticorpos gerados frente à proteína recombinante P1$_{39-512}$

Uma vez determinada a capacidade das vacinas em gerarem anticorpos que reconhecem epítopos da proteína P1$_{39-512}$, avaliamos em uma etapa seguinte a afinidade dos anticorpos gerados ao antígeno recombinante. A afinidade dos anticorpos foi determinada por ELISA empregando diferentes concentrações de tiocianato de amônio. A análise dos resultados demonstrou que as curvas de dissociação da interação antígeno-anticorpo foram semelhantes para os diferentes grupos vacinais (Figura 14A). No entanto, quando analisamos as concentrações de tiocianato de amônio necessárias para dissociar 50% dos anticorpos ligados à proteína P1$_{39-512}$, foi possível observar que os anticorpos gerados pelo grupo imunizado com a proteína coadministrada com ambos adjuvantes, de fato, foi o que apresentou maior afinidade para o antígeno, uma vez que maiores concentrações de tiocianato de amônio foram necessárias para dissociar metade dos anticorpos ligados (Figura 14B).

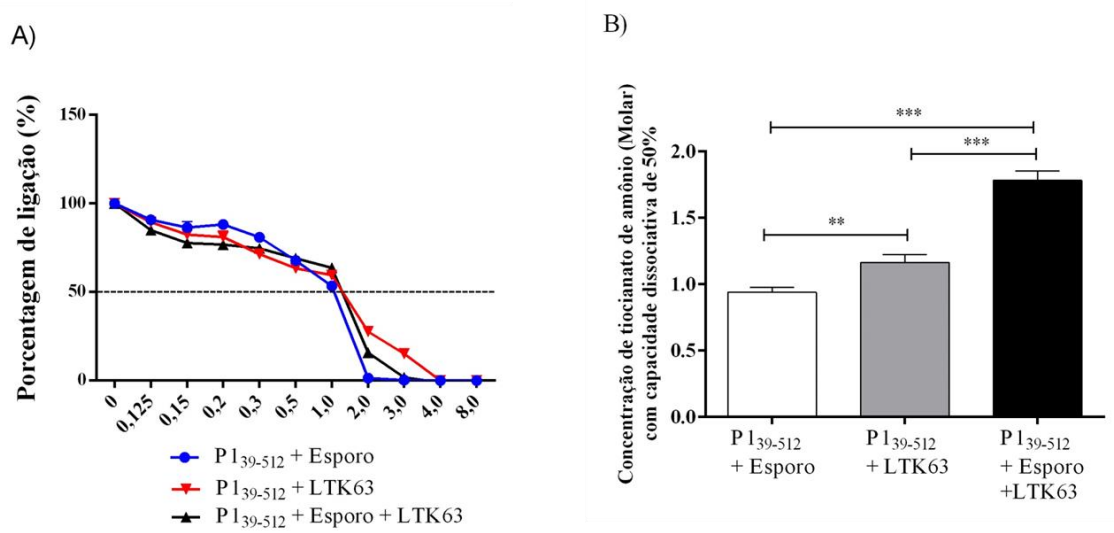

Figura 14 - Avaliação da afinidade dos anticorpos gerados frente ao antígeno $P1_{39-512}$. A afinidade dos anticorpos para o antígeno $P1_{39-512}$ foi determinado por ensaio de ELISA por meio da dissociação com tiocianato de amônio utilizando a proteína $P1_{39-512}$ como antígeno de fase sólida. Para a realização desse ensaio, os soros foram analisados em pool (referente à terceira dose de imunização) e normalizados para uma absorbância de 1 ($D.O._{492nm}$). (**A**) Afinidade dos anticorpos gerados nos grupos imunizados com a proteína ou com a proteína coadministrada com os adjuvantes. **(B)** Representação em barras das concentrações molares de tiocianato necessárias para dissociar 50% dos anticorpos ligados à $P1_{39-512}$. Os valores representam a média ± erro de um ensaio realizado em duplicata. .*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 (Two-way ANOVA com pós-test Bonferroni's).

4.8.3 Reatividade de anticorpos anti- $P1_{39-512}$ contra a proteína nativa P1 de S. mutans

Com objetivo de caracterizar a funcionalidade dos anticorpos gerados após o regime vacinal, testamos a reatividade dos soros obtidos duas semanas após a última dose de imunização quanto ao reconhecimento da proteína P1 nativa expressa na superfície de *S. mutans.* Para este fim, utilizamos três sorotipos de *S. mutans* como antígeno de fase sólida nos ensaios de ELISA: a linhagem UA159 (sorotipo c), B14 (sorotipo e) e a linhagem OMZ175 (sorotipo f). Conforme observado na figura 15, os anticorpos anti-$P1_{39-512}$ induzidos pelos esporos e/ou LTK63 foram capazes de reconhecer a P1 nativa expressa na superfície dos diferentes sorotipos de *S. mutans* avaliados. Contudo, podemos observar que quando a proteína é coadminstrada apenas com o adjuvante LTK63 são induzidos anticorpos com maior capacidade de reconhecimento para o antígeno.

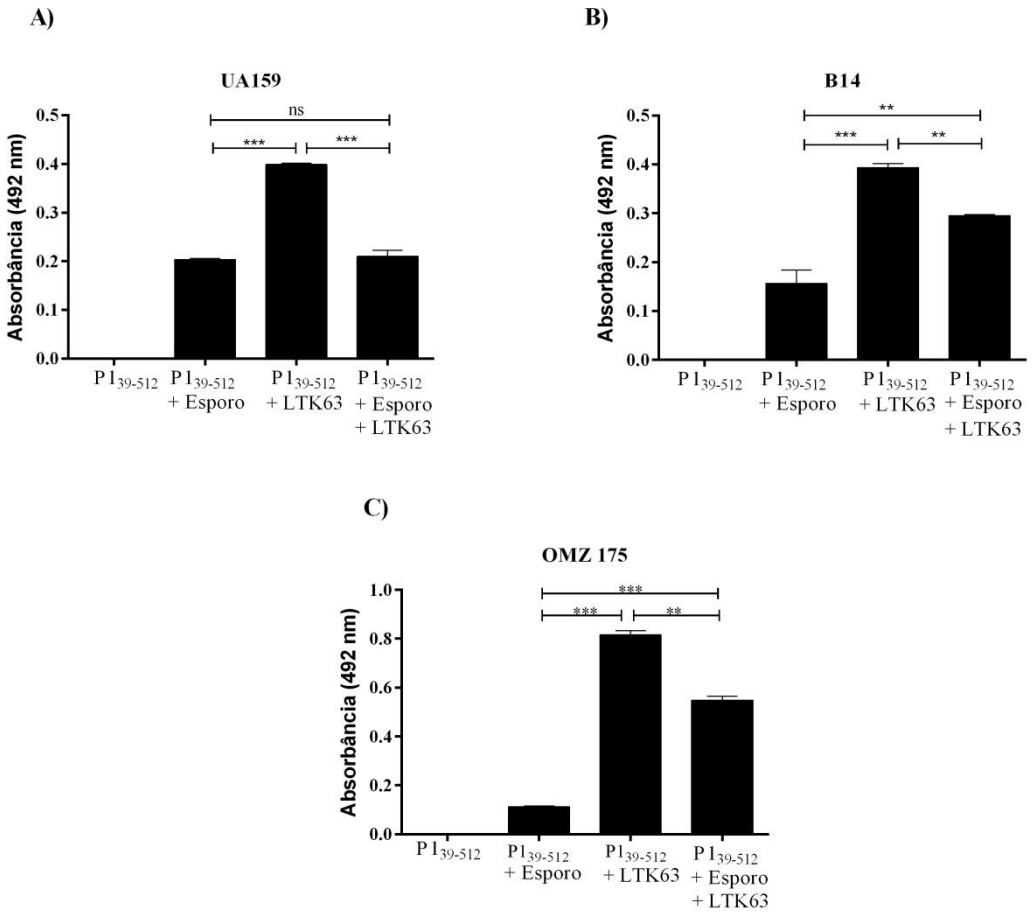

Figura 15 - Avaliação da capacidade dos anticorpos $P1_{39-512}$-específicos reconhecerem a proteína nativa expressa em células de *S. mutans*. Após o regime vacinal completo, os soros dos animais foram testados quanto à sua reatividade frente à proteína nativa expressa na superfície de diferentes sorotipos de *S. mutans*. Como antígeno de fase sólida foram utilizadas células inteiras de *S. mutans* linhagens: UA159 (sorotipo c) (A), B14(sorotipo e) (B), e OMZ175 (sorotipo f) (C). Resultados baseados em um único ensaio com amostras em pool medidas em duplicata. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (Two-away ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.9 Avaliação da resposta imunológica celular induzida pelas formulações vacinais

Para verificarmos se os adjuvantes foram capazes de ativar linfócitos T $CD8^+$ e T $CD4^+$ específicos para o antígeno, realizamos ensaios de citometria de fluxo com esplenócitos dos camundongos imunizados e estimulados *in vitro* com a proteína recombinante $P1_{39-512}$. Apesar de detectarmos níveis de IFN-γ no sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados *in vitro*, no ensaio de ICS observamos que houve uma fraca ativação de células T $CD8^+$ produtoras de IFN-γ, cujo percentual de ativação não teve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais (Figura 16). Observamos também que não foram encontradas células T $CD4^+$ IFN-γ^+. A ativação de linfócitos T $CD4^+$ produtores de IL-4 também foi avaliada e observamos

uma fraca ativação para todos os grupos vacinais (Figura 17). Em suma, os dados gerados a partir desta análise demonstram que na condição experimental avaliada não encontramos repostas celulares de linfócitos T $CD8^+$ e T $CD4^+$ ativados específicos para o antígeno $P1_{39-512}$.

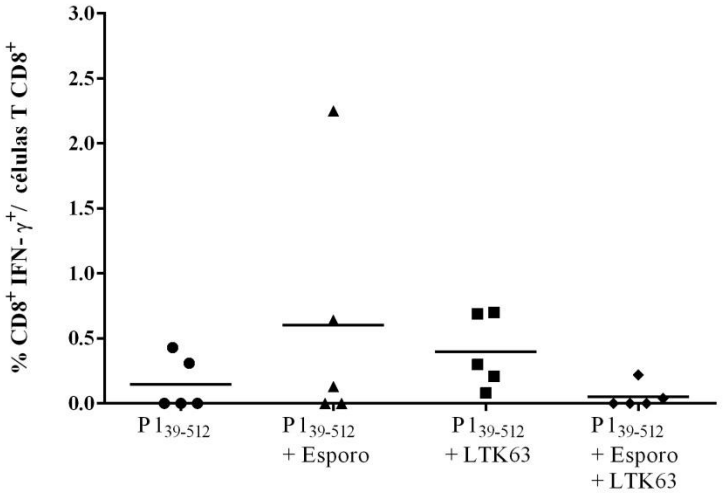

Figura 16 - Ativação de linfócitos T $CD8^+$ produtores de INF-γ específicos para o antígeno $P1_{39-512}$. A detecção das células T $CD8^+$ $P1_{39-512}$ específicas foi realizada em esplenócitos dos camundongos imunizados reestimulados *in vitro* por 16 horas com a proteína $P1_{39-512}$ e marcados com anticorpos fluorescentes para análise por citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células $TCD8^+$ INF-γ^+ sobre a população total de células T $CD8^+$ obtidas para cada grupo de imunização (n=5).

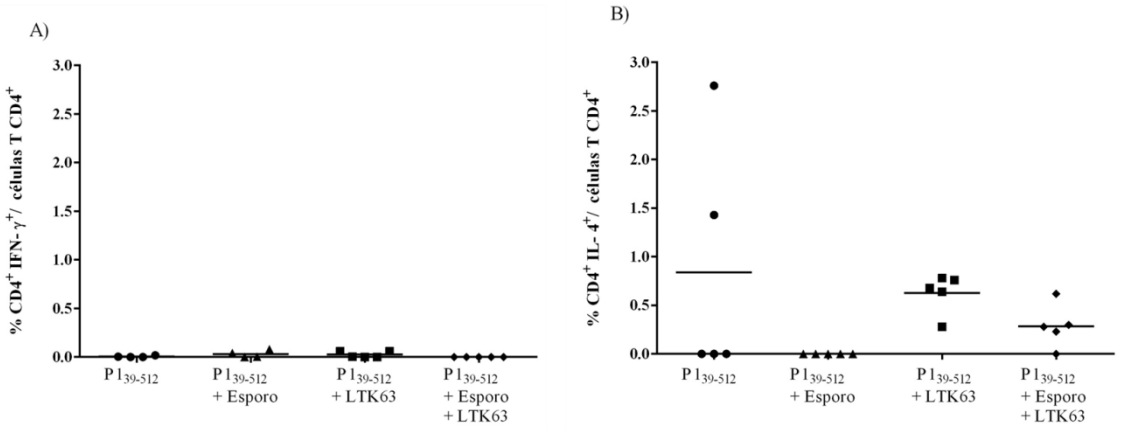

Figura 17 - Ativação de linfócitos T $CD4^+$ produtores de INF-γ e IL-4 específicos para o antígeno $P1_{39-512}$. A determinação das células T $CD4^+$ $P1_{39-512}$ específicas foi realizada com esplenócitos dos camundongos imunizados reestimulados *in vitro* por 16 horas com a proteína $P1_{39-512}$ e marcados com anticorpos fluorescentes para análise por citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células T $CD4^+$ INF-γ^+ (A) e T $CD4^+$ IL-4^+ sobre a população total de células T $CD4^+$ obtidas para cada grupo de imunização (n=5).

4.10 Novo protocolo de imunização para avaliação do efeito adjuvante dos esporos

Ainda com o objetivo de avaliar o papel imunomodulador dos esporos em nossa estratégia vacinal de mucosa contra o *S. mutans*, realizamos novo protocolo de imunização utilizando 10 x mais antígeno para verificar se a quantidade do antígeno utilizada na formulação vacinal poderia interferir no efeito adjuvante dos esporos. Grupos de 10 camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 6-8 semanas foram imunizados pela via sublingual em um regime vacinal de três doses, conforme protocolo anterior. Os animais foram imunizados com as seguintes formulações: 50 µg da $P1_{39-512}$ ou 50 µg da $P1_{39-512}$ coadministrada a 1 x 10^6 esporos. Animais controles foram tratados apenas com PBS. Amostras de sangue foram coletadas duas semanas após cada dose, e foram mensurados os níveis séricos de IgG específicos para a proteína $P1_{39-512}$. Observamos que os títulos de anticorpos séricos IgG anti-$P1_{39-512}$ foram detectados a partir da primeira dose de imunização para ambos os grupos e observamos um aumento gradual da resposta de anticorpos ao longo do regime vacinal (Figura 18).

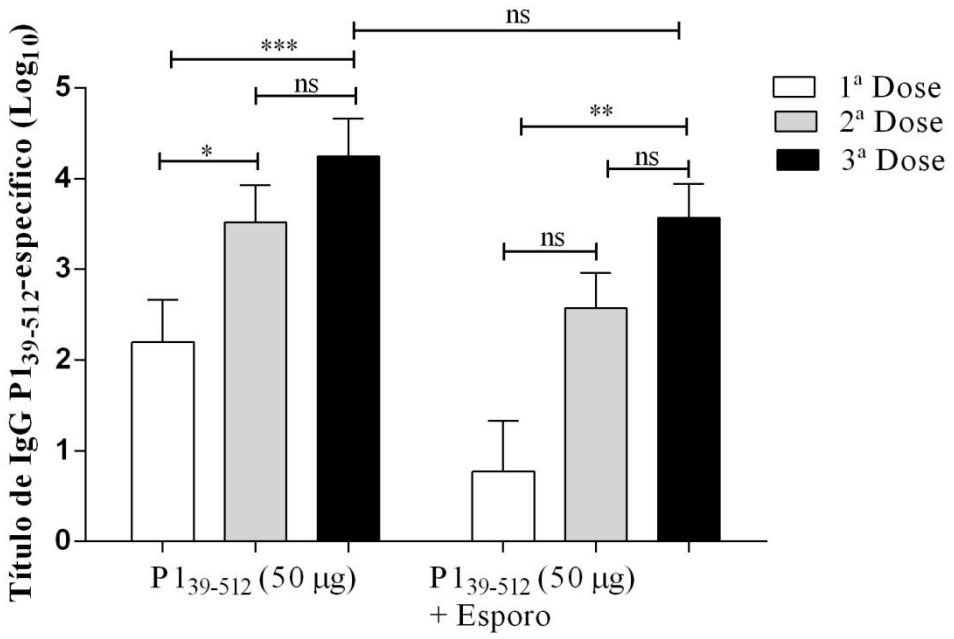

Figura 18 - Análise da resposta de anticorpos IgG $P1_{39-512}$ específicos gerados após nova estratégia de imunização. Camundongos da linhagem BALB/c fêmeas (n=10/grupo) foram imunizadas com três doses, por via sublingual com a proteína $P1_{39-512}$ (50 µg) ou em coadministração com 1 x 10^6 esporos de *B. subtilis*. Os títulos de IgG anti-$P1_{39-512}$ foram determinados por ELISA utilizando amostras de soro obtidas 14 dias após a administração de cada dose. Os dados apresentados na figura representam a média e o desvio-padrão dos títulos de anticorpos anti- $P1_{39-512}$ mensurados nas amostras de soros individuais dos grupos experimentais. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$(Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

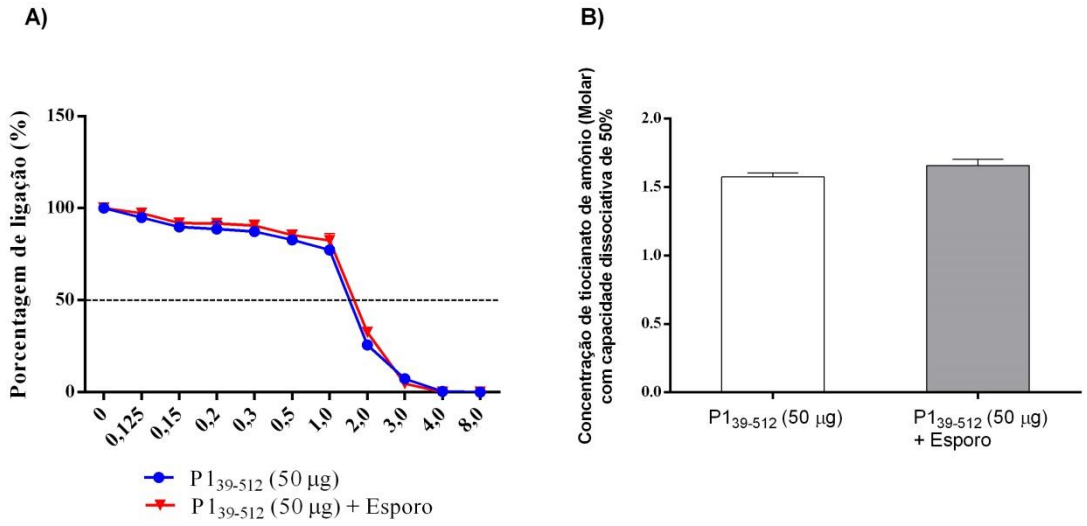

Figura 19 - Avaliação da afinidade dos anticorpos gerados frente ao antígeno $P1_{39-512}$ após novo protocolo de imunização. A afinidade dos anticorpos para o antígeno $P1_{39-512}$ foi determinado por ensaio de ELISA por dissociação com tiocianato de amônio utilizando a proteína $P1_{39-512}$ como antígeno de fase sólida. Para a realização deste ensaio, as amostras de soros foram reunidas em pool (referente à terceira dose de imunização) e normalizadas para uma absorbância de 1 ($D.O._{492nm}$).(**A**) Afinidade dos anticorpos gerados no grupos imunizados com 50 µg da proteína sozinha ou coadministrada com 1 x 10^6 esporos. **(B)** Representação em barras das concentrações molares de tiocianato necessárias para dissociar 50% dos anticorpos ligados a $P1_{39-512}$. Os valores representam a média ± erro de um ensaio realizado em duplicata. *** p< 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05 (Two-away ANOVA com pos-test Bonferroni's).

Comparada com a primeira estratégia, podemos concluir que o aumento da concentração do antígeno alvo foi fundamental para a indução da resposta de anticorpos específicos para a $P1_{39-512.}$ Apesar dos altos títulos de anticorpos induzidos após o aumento da concentração do antígeno administrado, podemos observar que os esporos não foram capazes de aumentar a magnitude da resposta de anticorpos nem a avidez ao antígeno $P1_{39-512}$ (Figura 19 A e B).

Para avaliar a modulação da resposta imunológica induzida pela nova estratégia vacinal, inicialmente analisamos a presença das subclasses de anticorpos IgG anti- $P1_{39-512}$ no soro obtido duas semanas após a última dose de imunização (Figura 20). O resultado da análise de subclasses dos anticorpos IgG e a razão entre os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a sugerem um padrão misto de resposta induzido por estas formulações. A dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de baço dos animais imunizados demonstrou que os níveis de IFN-γ (Figura 21 A) foram mais expressivos do que os da citocina IL-6 (Figura 21 B), tanto para o grupo imunizado com a proteína quanto para o

grupo tratado com a proteína coadministrada com os esporos. Além disso, observamos que a presença dos esporos na formulação, apesar de não modular o perfil de resposta, foi capaz de potencializar as resposta quanto à secreção das citocinas. Os níveis de todas as citocinas mensuradas foram maiores para os grupos imunizados com a proteína coadministada com os esporos, com exceção da citocina regulatória IL-10, cujos níveis foram semelhantes para o grupo imunizado apenas com a proteína (Figura 21 A- D). Ao analisarmos a relação entre as citocinas de padrão Th1 e Th2, nossos dados indicam que a modulação da resposta induzida pelo antígeno $P1_{39-512}$ tende para o perfil de resposta Th1 (Figura 21 E).

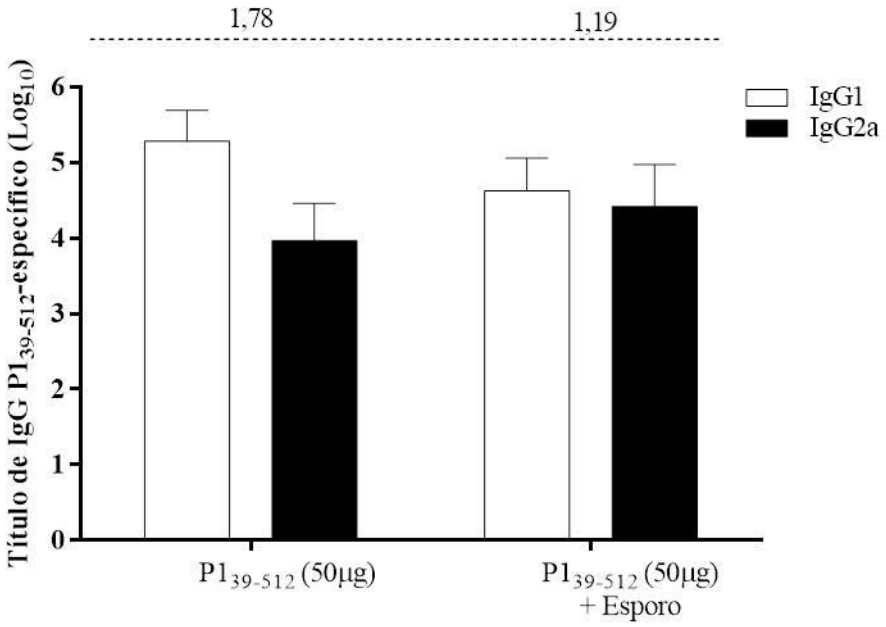

Figura 20 - Análise do perfil de subclasses de anticorpos IgG $P1_{39-512}$-específicos. Os títulos de subclasses de anticorpos IgG (IgG1, IgG2a) $P1_{39-512}$-específicos foram mensurados em amostras de soro (obtidos após a terceira dose de imunização) por ensaio de ELISA. Dados na parte superior do gráfico indicam a razão entre IgG1 e IgG2a para cada grupo de imunização. Os dados apresentados na figura representam a média e o desvios-padrão dos títulos de subclasses de IgG em amostras individuais dos soros obtidos para cada grupo de imunização. Os dados mostrados não apresentam diferenças estatísticas entre si.

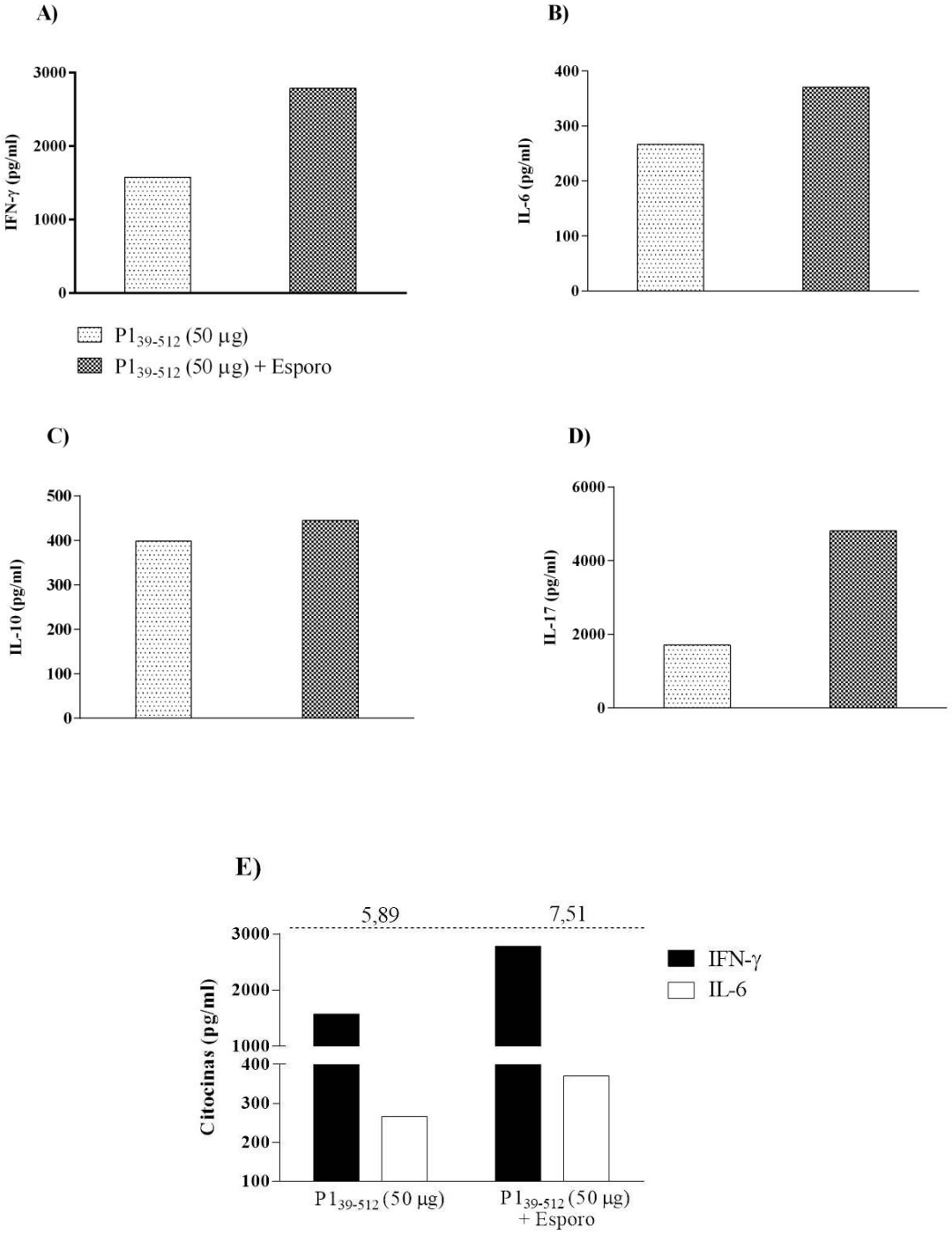

Figura 21 - Perfil de secreção de citocinas em células de animais imunizados com o antígeno P1$_{39-512}$ pela via sublingual. Os níveis das citocinas IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-17 (A-D), bem como a razão IFN-γ: IL-6 (E), foram determinados três semanas após a última dose da vacina em sobrenadante da cultura de esplenócitos reestimulados in vitro com 1 µg da proteína P1$_{39-512}$ purificada. Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 72 horas de contato com o estímulo e submetidos ao ensaio de CBA (*Cytometric Beads Assay*) e analisados em citometria de fluxo.

A fim de avaliar a resposta imune de mucosa induzida pela imunização sublingual após o novo protocolo de imunização, determinamos a presença de células

secretoras de anticorpos (CSA) IgA antígeno-específicas nos baços dos animais imunizados após a última dose. Observamos maior número de células CSA IgA $P1_{39-512}$ em esplenócitos estimulados *in vitro* para o grupo imunizado apenas com a proteína recombinante (Figura 21). Um dado interessante sobre a ativação da resposta de mucosa observada após esse novo protocolo de imunização foi que não houve aumento no número de spots por milhão de células para os grupos tratados com uma quantidade 10 vezes maior do antígeno (50 µg) quando comparado aos grupos experimentais das primeiras imunizações feitas com menor quantidade de antígeno.

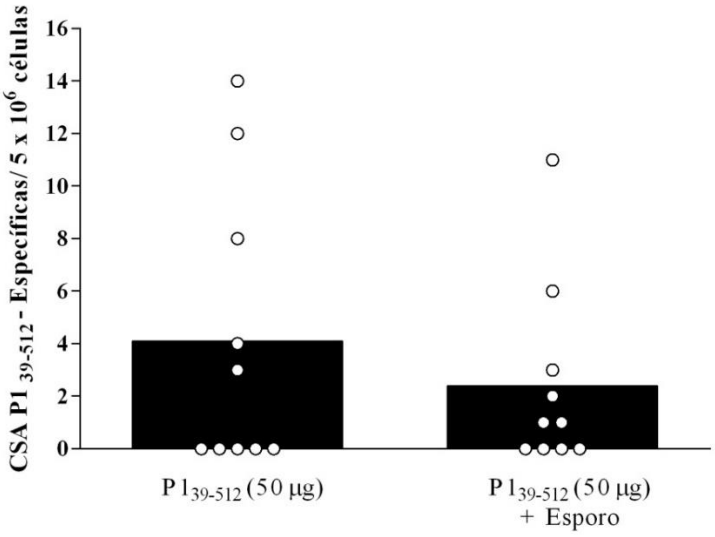

Figura 22 - Células secretoras de anticorpos IgA $P1_{39-512}$-específicas em animais submetidos ao regime vacinal sublingual com o antígeno $P1_{39-512}$. A presença de células secretoras de IgA antígeno-específicas foi determinada três semanas após a última dose de imunização em células de baço por ensaio de ELISPOT. Os esplenócitos foram incubados por 24 horas em presença ou ausência da proteína recombinante $P1_{39-512}$ (5 µg de $P1_{39-512}$). O gráfico apresenta o número de células produtoras de IgA para o grupo imunizado com 50 µg da proteína ou coadministrada com 1 x 10^6 esporos. Os resultados são baseados em um único experimento e representam a média e o desvio-padrão para os grupos vacinais.*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho buscou-se avaliar, o potencial adjuvante de esporos não recombinantes de *B. subtilis* e uma variante atóxica da LT de ETEC, a LTK63, ou a combinação destes, empregando-se uma via de mucosa, a via sublingual. Como antígeno modelo foi empregado um fragmento que engloba os resíduos de aminoácido de 39 ao 512 da proteína P1 de *S. mutans* UA159. As primeiras etapas do trabalho envolveram a obtenção do antígeno e dos adjuvantes a serem testados. Nossos resultados mostraram que as proteínas $P1_{39\text{-}512}$ e LTK63 foram obtidas em sua forma solúvel e com boa taxa de rendimento para a realização dos ensaios. Para a obtenção dos esporos de *B. subtilis*, o processo de purificação empregou o método lisozima/SDS que se mostrou eficaz e resultou na recuperação de esporos livres de células vegetativas ou restos celulares. O processo de purificação após a esporulação das linhagens em meios específicos representa uma etapa importante para o uso dos esporos para fins biotecnológicos ou para aplicações na área de vacinas, principalmente em estratégias que utilizam os esporos como adjuvantes, uma vez que a presença de células vegetativas nas suspenções de esporos pode influenciar nas respostas imunológicas (102).

Inicialmente, nos questionamos se a imunização com a proteína $P1_{39\text{-}512}$ em combinação com diferentes concentrações de esporo de *B. subtilis* seria capaz de potencializar a resposta de anticorpos antígeno-específicos quando inoculados por via sublingual. Observamos que a imunização com a proteína $P1_{39\text{-}512}$, na quantidade testada, não foi capaz de gerar respostas de anticorpos IgG antígeno-específico, entretanto quando complementamos a formulação com diferentes doses de esporos verificamos uma potencialização da resposta de IgG anti-$P1_{39\text{-}512}$. No entanto, a resposta humoral induzida foi independente da concentração de esporos testada na formulação vacinal. Em outro estudo realizado em nosso laboratório, empregando o esporo de *B. subtilis* em formulações vacinais contra tumores induzidos por HPV-16 utilizando vacina de DNA pgDE7h administradas por via subcutânea, o efeito adjuvante observado foi afetado pela concentração de esporos utilizada na formulação vacinal (105). Barnes e colaboradores (99) demonstraram que o efeito adjuvante de esporos de *B. subtilis* ocorre de forma dose-dependente. Nesse trabalho, o efeito adjuvante dos esporos foi avaliado utilizando dois modelos antigênicos: o fragmento C do toxóide tetânico (TT) e a ovoalbumina (OVA). Os resultados obtidos após imunização subcutânea ou por via intranasal mostraram que a resposta celular e humoral foi aumentada proporcionalmente à concentração de esporos coadministrados ao antígeno. Além disso, no regime vacinal

por via intranasal, as repostas de anticorpos S-IgA específicos aumentaram juntamente com a quantidade de esporos coadministrados. Desta forma, podemos observar que a capacidade adjuvante dos esporos, pode ser influenciada pela quantidade de esporos, capacidade antigênica do antígeno alvo, número de doses, bem como pela via de administração vacinal utilizada. Nossos dados demonstram que a via sublingual, embora interessante pela possibilidade de indução de respostas imunológicas locais, não se mostra adequada para a utilização de esporos coadministrados como adjuvante para vacinas baseadas em proteínas recombinantes.

Uma vez estabelecida a concentração de esporos a ser utilizada na formulação vacinal, em uma segunda etapa avaliamos a ação adjuvante da toxina mutante LTK63 assim como a combinação de esporos e LTK63 sobre a resposta humoral sistêmica específica para o antígeno $P1_{39-512}$. Demonstramos que a administração da LTK63 foi capaz de potencializar a resposta de anticorpos IgG e IgA antígeno-específica em comparação à formulação vacinal contendo o antígeno $P1_{39-512}$ coadministrado com esporo de *B. subtilis*. A combinação dos esporos e LTK63 não aumentou a reposta específica para a proteína $P1_{39-512}$ em relação aos animais imunizados apenas com a LTK63. Por outro lado, esporos inativados de *B. atrophaeus* em coadministração com outro adjuvante, a saponina, foi capaz de duplicar os títulos de anticorpos gerados para cada adjuvante individualmente em uma estratégia vacinal contra a raiva utilizando a via intraperitoneal (uso veterinário) (106).

A administração da LTK63, além de potencializar a resposta humoral gerada nos animais imunizados, foi capaz de modular o perfil de resposta induzindo um padrão de resposta balanceado, demonstrado pela presença das subclasses de IgG, especificamente IgG1 e IgG2a e pelo perfil de secreção de citocinas Th1(INF-γ) e Th2 (IL-6) . Dados da literatura demonstram que os perfis de resposta induzidos pela administração de LT e seus derivados podem ser influenciados pela via de administração, quantidade e características do antígeno alvo. As diferenças na modulação de respostas imunológicas pela LTK63 foram analisadas previamente e observou-se que, em doses altas, a LTK63 pode gerar um padrão de resposta balanceado Th1/Th2, enquanto doses mais baixas induzem preferencialmente uma resposta Th1 (80,107). O padrão de citocinas induzido pela administração da LTK63 observado neste trabalho corrobora os dados da literatura que demonstraram a expressão de citocinas, tais como IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10 e também IL-17, sendo esta última uma citocina típica do padrão de resposta Th17 (104,108). Embora o papel das células Th17 nas respostas imunológicas induzidas após

vacinação não seja totalmente compreendido, alguns estudos tem demonstrado que a ativação desse perfil de resposta desempenha um papel importante na imunidade protetora contra infecções bacterianas (109).

Estudos com esporos de *B. subtilis* demonstram que eles são capazes de induzir um perfil de resposta Th1 ou Th1/Th2 (88,94,110). Em nossa abordagem vacinal, os esporos induziram maiores títulos de anticorpos IgG1 e também foram observadas maiores quantidades de citocina IL-6 em sobrenadante de cultura de esplenócitos estimulados, sugerindo que a modulação da resposta foi preferencialmente direcionada para um perfil de resposta Th2. Com base nessa observação, acreditamos que os esporos são imunomoduladores flexíveis e que dependendo do antígeno coadministrado ou mesmo da via de administração utilizada podem se desencadear repostas de diferentes padrões de ativação de linfócitos T $CD4^+$ auxiliadores (Th).

Poucos são os dados da literatura sobre a ativação de resposta Th17 por esporos de *B. subtilis*. Em observações realizadas por Stasiłojć e colaboradores (111) empregando estratégias contra *Helicobacter pylori*, administrada por via oral utilizando esporos recombinantes, verificou-se a modulação da resposta humoral específica induzida para um perfil Th1 e Th17. Em outro estudo, onde os esporos foram coadministrados com o antígeno ESAT-6; Rv3875 de *Mycobacterium tuberculosis* por via subcutânea foi observado que não houve indução de níveis significativos de IL-17A quando comparado ao adjuvante monofosforil lipídeo A (MPL), amplamente utilizado em estratégias vacinais contra a tuberculose (112). Esses dados sugerem que a produção da citocina IL-17 pode ser influenciada por diferentes fatores quando da utilização de esporos de *B. subtilis*, particularmente pela utilização de esporos geneticamente modificados.

Quando avaliamos o perfil de repostas induzidas em animais submetidos a vacinas com a combinação dos dois adjuvantes (esporos e LTK63) coadministrados ao antígeno observamos a modulação da resposta para um perfil Th1, visto a quantidade expressiva de IFN-γ produzido em relação à quantidade de IL-6. Também observamos que a combinação dos adjuvantes foi capaz de aumentar a secreção da citocina IL-10, que normalmente esta associada a processos regulatórios da resposta imunológica. Esses dados indicam que a incorporação de esporos não foi capaz de aumentar a quantidade de anticorpos induzidos, mas promoveu a modulação de pelo menos parte das respostas imunológicas induzidas em animais submetidos à vacinação pela via sublingual.

Observamos que além de estimular a produção de anticorpos sistêmicos o regime vacinal sublingual com a $P1_{39-512}$, coadministrada com a LTK63 ou combinada com os dois adjuvantes, foi capaz de estimular componentes do sistema imune de mucosa. Para esses grupos vacinais, títulos semelhantes de anticorpos S-IgA foram encontrados nas amostras de saliva. Esses dados sugerem o papel preponderante do adjuvante LTK63 na modulação da resposta de anticorpos S-IgA específicos para o antígeno $P1_{39-512}$ quando administrada pela via sublingual em combinação com proteínas recombinantes.

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram outras estratégias vacinais que empregaram CT ou LT como adjuvantes em abordagens vacinais contra a cárie dental (85,113,114). Alguns estudos demonstraram que a utilização de proteínas recombinantes quiméricas construídas a partir da proteína P1 ou fragmentos, como a proteína SBR, em combinação com CT ou derivados de LT, como LT-IIa e LT-IIb, induzem repostas de anticorpos sistêmicos e IgA secretores antígeno específico após administração pela via intranasal. Zhao e colaboradores (113) observaram que, além de modular as respostas de anticorpos, a combinação de proteína quimérica a partir da fusão da SBR com derivados de LT aumentou o número de células B e de macrófagos nas placas de Payer e nos linfonodos mesentéricos (MLN) de camundongos imunizados pela via intragástrica. Smith e colaboradores (115), empregando como alvo vacinal epítopos derivados da enzima glicosiltransferase de *S. mutans* em associação com uma variante da LT, mostraram a indução de respostas de anticorpos IgA salivar, em níveis semelhantes ao obtido com CT, após imunização intranasal.

A resposta de células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas depende de interleucinas específicas, tais como IL-4, IL-5 e IL-6 que induzem ativação, proliferação e diferenciação das células B. A IL-6 apresenta um papel crítico sobre as respostas de IgA nas secreções de mucosa (116–118). Nossos resultados demonstram que a administração do adjuvante LTK63 induziu níveis aumentados dessa citocina. Esses dados corroboram os resultados de respostas de células secretoras de IgA, em que o adjuvante LTK63 induziu a maior ativação dessas células no baço de camundongos imunizados. Entretanto, não observamos o mesmo perfil de resposta quando os esporos foram combinados com a LTK63, uma vez que observamos menor número de células secretoras de IgA ativadas quando comparado à administração da proteína com a LTK63. Essa observação indica que, após a administração pela via sublingual, a utilização de esporos combinados à vacina suprime as respostas locais de IgA.

A correlação de células secretoras de IgA com as respostas de anticorpos secretados em mucosa foram relatadas em diversos trabalhos (119–122). Russell e colaboradores (116) avaliaram as respostas das células secretoras de IgM, IgG e IgA nos linfonodos drenantes da região da cabeça e pescoço, em esplenócitos e em glândulas salivares de camundongos Balb/c após imunização intranasal do antígeno I/II (proteína P1), conjugado ou não à subunidade B da toxina CT (AgI / II-CTB). Os resultados demonstraram que a administração do antígeno induziu baixos níveis das células secretoras de IgA em todos os sítios avaliados. No entanto, quando o antígeno era conjugado à CTB os níveis das células secretoras de IgA aumentavam, principalmente nas células das glândulas salivares. Apesar das estratégias serem diferentes, esses dados corroboram nossos resultados, e confirmam o potencial adjuvante das enterotoxinas em vacinas de mucosa.

Também avaliamos os aspectos qualitativos dos anticorpos gerados após a imunização com as diferentes formulações pela via sublingual. Analisamos a reatividade dos anticorpos quanto ao reconhecimento de epítopos conformacionais ou lineares da proteína recombinante e também a afinidade desses para o antígeno. Os anticorpos anti-$P1_{39\text{-}512}$ induzidos pelas formulações contendo esporos e/ou LTK63 foram capazes de reconhecer tanto epítopos conformacionais quanto lineares da proteína recombinante, com maior prevalência para os últimos. Esses resultados corroboram dados de Tavares e colaboradores (43) que demonstram comportamento semelhante sobre o perfil de reatividade dos anticorpos específicos frente a epítopos da proteína $P1_{39\text{-}512}$. Outra observação feita no presente estudo descreve o papel da coadministração de esporos na avidez dos anticorpos gerados frente ao antígeno vacinal. Apesar dos esporos e LTK63 induzirem anticorpos que reconhecem de forma semelhante epítopos da proteína recombinante $P1_{39\text{-}512}$, observamos que a combinação dos dois adjuvantes induziu a formação de anticorpos com maior avidez para o antígeno do que aqueles gerados com LTK63.

A ativação de células T em reposta a antígenos coadministrados com esporo ou com as LTs são descritas em diferentes trabalhos (79,95,105,123). Entretanto em nossa análise não encontramos células T $CD4^+$ ou T $CD8^+$ antígeno-específicas ativadas. Esses resultados não descartam a ativação destas células pelas vacinas testadas. Uma análise mais aprofundada de células extraídas de linfonodos drenantes pode ser uma abordagem que demonstre de forma mais eficaz a ativação dos linfócitos T $CD4^+$ ou

$TCD8^+$ pelas vacinas administras pela via sublingual ou mesmo a análise a partir de outros ensaios experimentais como o ELISPOT.

Um dos mecanismos contra a colonização por *S. mutans* é o reconhecimento de regiões funcionais da proteína P1 por anticorpos com capacidade de bloquear a adesão do patógeno à película adsorvida ao dente, especificamente os sítios de ligação à glicoproteína salivar (SAG). O antígeno avaliado neste estudo apresenta um dos sítios de ligação à SAG, identificado na porção N-terminal da proteína P1. Dessa forma, avaliamos se anticorpos induzidos após a última dose vacinal seriam capazes de reconhecer a proteína P1 nativa expressa na superfície de linhagens sorologicamente distintas de *S. mutans* (sorotipo **c**, **e** e **f**). Observamos que as estratégias utilizadas induziram anticorpos capazes de reconhecer a proteína P1 nativa expressa nas linhagens de *S. mutans* avaliadas. Entretanto, observamos que a coadministração com o adjuvante LTK63 aumentou de forma significativa a reatividade dos anticorpos frente à proteína P1 nativa. Esses resultados demonstram que o uso de LTK63 em vacinas contra a cárie dental quando administrada pela via sublingual pode aumentar à produção de anticorpos com capacidade de interferir no primeiro estágio de adesão do patógeno à película dental.

Na segunda etapa do projeto analisamos se a modulação dos esporos sobre o antígeno poderia ser influenciada pela quantidade do antígeno presente na formulação vacinal. Dessa forma, mantivemos o mesmo regime vacinal de três doses por via sublingual, porém aumentamos em 10 vezes a quantidade do antígeno administrado. O efeito adjuvante dos esporos sobre a resposta imunológica humoral, foi analisada a partir das respostas de anticorpos séricos IgG anti-$P1_{39-512}$ e também por meio da avaliação da ativação de respostas de mucosa. Os resultados demonstraram que o efeito da proteína administrada é equivalente ou supera a resposta induzida na presença de esporos. Esses resultados sugerem que a atividade adjuvante induzida pelos esporos está diretamente relacionada com a quantidade do antígeno empregada na formulação, visto que o efeito adjuvante dos esporos foi limitada a condições que empregaram menores quantidades de proteína recombinante. Além disso, a ausência do efeito adjuvante dos esporos na segunda estratégia vacinal também se refletiu na avidez dos anticorpos ao antígeno bem como na ativação das células secretoras de IgA. Por outro lado, embora a presença de esporos na formulação não tenha sido capaz de modular quantitativamente as respostas de anticorpos sistêmicos, eles levaram a uma mudança no perfil de secreção de citocinas, com níveis mais elevados das citocinas IFN-γ, IL-6, e IL-17.

O aprimoramento de estratégias vacinais por meio do uso de adjuvantes é um aspecto fundamental para o desenvolvimento de vacinas de mucosa. No presente trabalho demostramos que o uso da LTK63 coadministrada ao antígeno $P1_{39-512}$ foi capaz de aumentar e modular as respostas de anticorpos sistêmicos antígeno-específicos bem como a resposta de anticorpos de mucosa, como medido pelo número de células secretoras de IgA antígeno-específico. No entanto, nossos dados indicam que, pela via sublingual, a adição de esporos à formulação vacinal não melhorou, tanto em termos quantitativos como qualitativos, as respostas imunológicas induzidas. Tais resultados trazem mais informações sobre o uso de adjuvantes pela via sublingual e abrem perspectivas relacionadas ao uso da LTK63 como adjuvante em abordagens vacinais contra a cárie dental.

6 CONCLUSÕES

- A proteína $P1_{39-512}$, utilizada como antígeno alvo, apresentou baixa imunogenicidade quando administrada por via sublingual em camundongos. No entanto, quando associada aos adjuvantes, foram observadas respostas de anticorpos sistêmicos específicos para o antígeno.
- O adjuvante LTK36 foi capaz de induzir os maiores títulos de anticorpos antígeno-específicos e desencadear respostas de mucosa com indução de anticorpos S-IgA em amostras de saliva.
- A combinação dos esporos não aumentou a magnitude das respostas de anticorpos sistêmicos e secretores quando comparada à administração da $P1_{39-512}$ + LTK63.
- A administração da proteína $P1_{39-512}$ em combinação com LTK63 induziu respostas de anticorpos com capacidade de reconhecer a proteína P1 nativa na superfície de diferentes linhagens de *S. mutans*.
- Nas condições avaliadas não foram detectadas respostas de células T $CD8^+$ ou T $CD4^+$ ativadas específicas para o antígeno em animais imunizados pela via sublingual com as diferentes formulações testadas.
- Os resultados obtidos abrem perspectivas para o uso da LTK63 como adjuvante em imunizações pela via sublingual com antígenos de *S. mutans* em estratégias direcionadas para o controle da cárie dental humana.

REFERÊNCIAS*

1. Singh Gambhir R, Singh S. Vaccine against Dental Caries- An Urgent Need. J Vaccines Vaccin. 2012;3(2).

2. Shivakumar K, Vidya S, Chandu G. Dental caries vaccine. Indian J Dent Res. 2009;20(1):99.

3. Petersen PE, Ogawa H. Prevention of dental caries through the use of fl uoride – the WHO approach Fluoride and prevention of dental caries. Community Dent Health. 2016;33:66–8.

4. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. Microbiol Rev. 1980;44(2):331–84.

5. WJ. L. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev. 1986;50(4):353–380.

6. Banas JA. Virulence properties of Streptococcus mutans. Front Biosci [Internet]. 2004 May 1 [cited 2017 Nov 19];9:1267–77. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977543

7. Sullan RMA, Li JK, Crowley PJ, Brady LJ, Dufrêne YF. Binding Forces of *Streptococcus mutans* P1 Adhesin. ACS Nano [Internet]. 2015 Feb 24 [cited 2017 Nov 25];9(2):1448–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671413

8. Sullan RMA, Li JK, Crowley PJ, Brady LJ, Dufrêne YF. Binding forces of Streptococcus mutans P1 adhesin. ACS Nano. 2015 Feb;9(2):1448–60.

9. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. Streptococcus Adherence and Colonization. Microbiol Mol Biol Rev. 2009;73(3):407–50.

10. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of Streptococcus mutans with a Cell Wall Polysaccharide Specific to a New Serotype, k, in the Human Oral Cavity. J Clin Microbiol. 2004;42(1):198–202.

11. Nakano K, Ooshima T. Serotype classification of Streptococcus mutans and its detection outside the oral cavity. Future Microbiol. 2009;4(7):891–902.

12. Hamada S, Koga T, Ooshima T. Virulence factors of Streptococcus mutans and dental caries prevention. J Dent Res. 1984 Mar;63(3):407–11.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htlm.

13. Michalek SM, Hirasawa M, Kiyono H, Ochiai K, McGhee JR. Oral ecology and virulence of Lactobacillus casei and Streptococcus mutans in gnotobiotic rats. Infect Immun. 1981 Sep;33(3):690–6.

14. Taubman MA, Nash DA. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. Nat Rev Immunol [Internet]. 2006 Jul 26 [cited 2017 Nov 19];6(7):555–63. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16729013

15. Hajishengallis G, Michalek SM. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. Oral Microbiol Immunol. 1999;14(1):1–20.

16. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of Streptococcus mutans and the ability to form biofilms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Apr;33(4):499–515.

17. Takahashi N, Horiuchi M, Yamada T. Effects of acidification on growth and glycolysis of Streptococcus sanguis and Streptococcus mutans. Oral Microbiol Immunol. 1997;12(2):72–6.

18. Balakrishnan M. Dental Caries is A Preventable Infectious Disease. Aust Dent J. 2000;45(4):235–45.

19. Clancy KA, Pearson S, Bowen WH, Burne RA. Characterization of recombinant, ureolytic Streptococcus mutans demonstrates an inverse relationship between dental plaque ureolytic capacity and cariogenicity. Infect Immun. 2000;68(5):2621–9.

20. Lemos JAC, Abranches J, Burne RA. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. Curr Issues Mol Biol. 2005 Jan;7(1):95–107.

21. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by Streptococcus mutans. Microbiology. 2008 Nov;154(Pt 11):3247–55.

22. Koga T, Oho T, Shimazaki Y, Nakano Y. Immunization against dental caries. Vol. 20, Vaccine. 2002. p. 2027–44.

23. Yan HM. Salivary IgA enhancement strategy for development of a nasal-spray anti-caries mucosal vaccine. Vol. 56, Science China Life Sciences. 2013. p. 406–13.

24. Russell MW, Childers NK, Michalek SM, Smith DJ, Taubmand MA. A caries vaccine? The state of the science of immunization against dental caries. In: Caries Research. 2004. p. 230–5.

25. Smith DJ. Dental caries vaccines: prospects and concerns. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13(4):335–49.

26. Wu H, Russell MW. Immunological cross-reactivity between Streptococcus mutans and human heart tissue examined by cross-immunization experiments. Infect Immun. 1990;58(11):3545–52.

27. Russell MW, Challacombe SJ, Lehner T. Specificity of antibodies induced by Streptococcus mutans during immunization against dental caries. Immunology [Internet]. 1980;40(1):97–106. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007419244

28. Gregory RL, Filler SJ. Protective secretory immunoglobulin A antibodies in humans following oral immunization with Streptococcus mutans. Infect Immun. 1987;55(10):2409–15.

29. Shimazaki Y, Mitoma M, Oho T, Nakano YY, Yamashita Y, Okano K, et al. Passive Immunization with Milk Produced from an Immunized Cow Prevents Oral Recolonization by Streptococcus mutans. Clin DiagnLabImmunol. 2001;8(6):1136–9.

30. Ma JKC, Hikmat BY, Wycoff K, Vine ND, Chargelegue D, Yu L, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. Nat Med. 1998;4(5):601–6.

31. Michalek SM, Gregory RL, Harmon CC, Katz J, Richardson GJ, Hilton T, et al. Protection of gnotobiotic rats against dental caries by passive immunization with bovine milk antibodies to Streptococococcus mutans. Infect Immun. 1987;55(10):2341–7.

32. Oho T, Shimazaki Y, Mitoma M. Bovine milk antibodies against cell surface protein antigen PAc-glucosyltransferase fusion protein suppress cell adhesion and alter glucan synthesis of Streptococcus. J Nutr. 1999;(July):1836–41.

33. Forester H, Hunter N, Knox KW. Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of Streptococcus mutans. J Gen Microbiol. 1983 Sep;129(9):2779–88.

34. Zhang S, Green NM, Sitkiewicz I, Lefebvre RB, Musser JM. Identification and characterization of an antigen I/II family protein produced by group A Streptococcus. Infect Immun. American Society for Microbiology; 2006 Jul;74(7):4200–13.

35. Seifert TB, Bleiweis AS, Brady LJ. Contribution of the Alanine-Rich Region of Streptococcus mutans P1 to Antigenicity, Surface Expression, and Interaction with the Proline-Rich Repeat Domain. Infect Immun. 2004 Aug;72(8):4699–706.

36. Larson MR, Rajashankar KR, Crowley PJ, Kelly C, Mitchell TJ, Brady LJ, et al. Crystal structure of the C-terminal region of Streptococcus mutans antigen I/II and characterization of salivary agglutinin adherence domains. J Biol Chem. 2011 Jun;286(24):21657–66.

37. Larson MR, Rajashankar KR, Patel MH, Robinette RA, Crowley PJ, Michalek S, et al. 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. 2010 Mar;107(13):5983–8.

38. Tang W, Bhatt A, Smith AN, Crowley PJ, Brady LJ, Long JR. Specific binding of a naturally occurring amyloidogenic fragment of Streptococcus mutans adhesin P1 to intact P1 on the cell surface characterized by solid state NMR spectroscopy. J Biomol NMR. 2016 Feb;64(2):153–64.

39. Smith DJ. Caries vaccines for the twenty-first century. J Dent Educ. 2003 Oct;67(10):1130–9.

40. Brady LJ, Maddocks SE, Larson MR, Forsgren N, Persson K, Deivanayagam CC, et al. The changing faces of Streptococcus antigen I/II polypeptide family adhesins. Mol Microbiol [Internet]. 2010 May 24 [cited 2017 Nov 19];77(2):276–86. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497507

41. Tavares MB, Silva BM, Cavalcante RCM, Souza RD, Luiz WB, Paccez JD, et al. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of Streptococcus mutans P1 protein produced by a recombinant Bacillus subtilis strain. FEMS Immunol Med Microbiol [Internet]. NIH Public Access; 2010 Jul 1 [cited 2017 Nov 19];59(2):131–42. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20402772

42. Batista MT, Souza RD, Paccez JD, Luiz WB, Ferreira EL, Cavalcante RCM, et al. Gut adhesive Bacillus subtilis spores as a platform for mucosal delivery of antigens. Infect Immun. 2014;82(4):1414–23.

43. Batista MT, Souza RD, Ferreira EL, Robinette R, Crowley PJ, Rodrigues JF, et al. Immunogenicity and in vitro and in vivo protective effects of antibodies targeting a recombinant form of the Streptococcus mutans P1 surface protein. Infect Immun [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2014 Dec [cited 2017 Nov 19];82(12):4978–88. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25225243

44. Holmgren J, Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. Nat Med. 2005;11(4S):S45.

45. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: Potential and limitations. Vol. 12, Nature Reviews Immunology. 2012. p. 592–605.

46. Chen F, Wang D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. Expert Opin Ther Pat. 2010;20(5):681–94.

47. Çuburu N, Kweon M-N, Song J-H, Hervouet C, Luci C, Sun J-B, et al. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. Vaccine [Internet]. 2007 Dec 12 [cited 2017 Nov 20];25(51):8598–610. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996991

48. Amuguni H, Lee S, Kerstein K, Brown D, Belitsky B, Herrmann J, et al. Sublingual immunization with an engineered Bacillus subtilis strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. Microbes Infect [Internet]. 2012 May [cited 2017 Nov 20];14(5):447–56. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198093

49. Lavelle EC. Generation of improved mucosal vaccines by induction of innate immunity. Cell Mol Life Sci. 2005 Dec;62(23):2750–70.

50. De Magistris MT. Mucosal delivery of vaccine antigens and its advantages in pediatrics. Adv Drug Deliv Rev. 2006 Apr;58(1):52–67.

51. Kraan H, Vrieling H, Czerkinsky C, Jiskoot W, Kersten G, Amorij JP. Buccal and sublingual vaccine delivery. J Control Release. 2014;190:580–92.

52. Mašek J, Lubasová D, Lukáč R, Turánek-Knotigová P, Kulich P, Plocková J, et al. Multi-layered nanofibrous mucoadhesive films for buccal and sublingual administration of drug-delivery and vaccination nanoparticles - important step towards effective mucosal vaccines. J Control Release. 2017;249:183–95.

53. Kweon MN. Sublingual mucosa: A new vaccination route for systemic and mucosal immunity. Vol. 54, Cytokine. 2011. p. 1–5.

54. Shim B-S, Stadler K, Nguyen H, Yun C-H, Kim D, Chang J, et al. Sublingual immunization with recombinant adenovirus encoding SARS-CoV spike protein induces systemic and mucosal immunity without redirection of the virus to the brain. Virol J. 2012;9(1):215.

55. Song JH, Nguyen HH, Cuburu N, Horimoto T, Ko SY, Park SH, et al. Sublingual vaccination with influenza virus protects mice against lethal viral infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(5):1644–9.

56. Cuburu N, Kweon M-N, Hervouet C, Cha H-R, Pang Y-YS, Holmgren J, et al. Sublingual Immunization with Nonreplicating Antigens Induces Antibody-Forming Cells and Cytotoxic T Cells in the Female Genital Tract Mucosa and Protects against Genital Papillomavirus Infection. J Immunol. 2009;183(12):7851–9.

57. Hervouet C, Luci C, Çuburu N, Cremel M, Bekri S, Vimeux L, et al. Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in the mouse female genital tract. Vaccine. 2010;28(34):5582–90.

58. Yuki Y, Kiyono H. New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. Vol. 13, Reviews in Medical Virology. 2003. p. 293–310.

59. Ferreira EL, Batista MT, Cavalcante RCM, Pegos VR, Passos HM, Silva DA, et al. Sublingual immunization with the phosphate-binding-protein (PstS) reduces oral colonization by *Streptococcus mutans*. Mol Oral Microbiol [Internet]. 2016 Oct [cited 2017 Nov 19];31(5):410–22. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/omi.12142

60. Lee S, Nguyen MT. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious

Diseases. Immune Netw. 2015;15(2):51.

61. O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. Nat Rev Drug Discov. 2003;2(9):727–35.

62. Apostólico J de S, Lunardelli VAS, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, *Modus Operandi* , and Licensing. J Immunol Res. Hindawi; 2016 May;2016:1–16.

63. Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. Nat Med. 2005;11(4S):s63.

64. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. Vol. 4, Frontiers in Immunology. 2013.

65. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: Putting innate immunity to work. Vol. 33, Immunity. 2010. p. 492–503.

66. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. Immunol Cell Biol. 2004;82:488–96.

67. Lawson LB, Norton EB, Clements JD. Defending the mucosa: Adjuvant and carrier formulations for mucosal immunity. Vol. 23, Current Opinion in Immunology. 2011. p. 414–20.

68. Garçon N, Leroux-Roels G, Cheng WF. Vaccine adjuvants. Perspect Vaccinol. 2011;1(1):89–113.

69. Mutwiri G, Gerdts V, van Drunen Littel-van den Hurk S, Auray G, Eng N, Garlapati S, et al. Combination adjuvants: the next generation of adjuvants? Expert Rev Vaccines. 2011;10(1):95–107.

70. Mount A, Koernig S, Silva A, Drane D, Maraskovsky E, Morelli AB. Combination of adjuvants: the future of vaccine design. Expert Rev Vaccines. 2013;12(7):733–46.

71. Garg R, Babiuk L, van Drunen Littel-van den Hurk S, Gerdts V. A novel combination adjuvant platform for human and animal vaccines. Vaccine. 2017;35(35):4486–9.

72. Pasquale A, Preiss S, Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. Vaccines. 2015;3(2):320–43.

73. Levast BT, Awate S, Babiuk L, Mutwiri G, Gerdts V, Van S, et al. Vaccine Potentiation by Combination Adjuvants. Vaccines. 2014;2:297–322.

74. Pizza M, Giuliani MM, Fontana MR, Monaci E, Douce G, Dougan G, et al. Mucosal vaccines: Non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. In: Vaccine. 2001. p. 2534–41.

75. Hajishengallis G, Arce S, Gockel CM, Connell TD, Russell MW. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or

tolerance: applications for oral infections. J Dent Res. 2005;84(12):1104–16.

76. Cox E, Verdonck F, Vanrompay D, Goddeeris B. Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. Vol. 37, Veterinary Research. 2006. p. 511–39.

77. Sixma TK, Kalk KH, van Zanten BAM, Dauter Z, Kingma J, Witholt B, et al. Refined structure of Escherichia coli heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. Vol. 230, Journal of molecular biology. 1993. p. 890–918.

78. Rappuoli R, Pizza M, Douce G, Dougan G. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and Escherichia coli heat-labile enterotoxins. Vol. 20, Immunology Today. 1999. p. 493–500.

79. Braga CJM, Rodrigues JF, Medina-Armenteros Y, Farinha-Arcieri LE, Ventura AM, Boscardin SB, et al. Parenteral adjuvant effects of an enterotoxigenic Escherichia coli natural heat-labile toxin variant. Front Immunol. 2014;4(JAN).

80. Freytag LC, Clements JD. Mucosal adjuvants. Vaccine. 2005 Mar;23(15):1804–13.

81. Ma Y. Recent advances in nontoxic Escherichia coli heat-labile toxin and its derivative adjuvants. Vol. 15, Expert Review of Vaccines. 2016. p. 1361–71.

82. Peppoloni S, Ruggiero P, Contorni M, Morandi M, Pizza M, Rappuoli R, et al. Mutants of the Escherichia coli heat-labile enterotoxin as safe and strong adjuvants for intranasal delivery of vaccines. Expert Rev Vaccines. 2003;2(2):285–93.

83. Gockel CM, Russell MW. Induction and recall of immune memory by mucosal immunization with a non-toxic recombinant enterotoxin-based chimeric protein. Immunology. 2005;116(4):477–86.

84. Hajishengallis G, Russell MW, Michalek SM. 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 [Internet]. 1998 Apr [cited 2017 Nov 19];66(4):1740–3. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529105

85. Nawar HF, Greene CJ, Lee CH, Mandell LM, Hajishengallis G, Connell TD. LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family, exhibits potent immunomodulatory properties that are different from those induced by LT-IIa or LT-IIb. Vaccine. 2011;29(4):721–7.

86. Duc LH, Hong HA, Fairweather N, Ricca E, Cutting SM. Bacterial spores as vaccine vehicles. Infect Immun [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2003 May [cited 2017 Nov 19];71(5):2810–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704155

87. Ivins BE, Welkos SL. Cloning and expression of the Bacillus anthracis protective antigen gene in Bacillus subtilis. Infect Immun. 1986 Nov;54(2):537–42.

88. Amuguni H, Tzipori S. Bacillus subtilis: a temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. Vol. 8, Human vaccines & immunotherapeutics. 2012. p. 979–86.

89. McKenney PT, Driks A, Eichenberger P. The Bacillus subtilis endospore: assembly and functions of the multilayered coat. Nat Rev Microbiol. 2012 Dec;11(1):33–44.

90. Ferreira LCS, Ferreira RCC, Schumann W. Bacillus subtilis as a tool for vaccine development: From antigen factories to delivery vectors. An Acad Bras Cienc. 2005;77(1):113–24.

91. Song M, Hong HA, Huang JM, Colenutt C, Khang DD, Nguyen TVA, et al. Killed Bacillus subtilis spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. Vaccine. 2012;30(22):3266–77.

92. Ricca E, Baccigalupi L, Cangiano G, De Felice M, Isticato R. Mucosal vaccine delivery by non-recombinant spores of Bacillus subtilis. Microb Cell Fact. 2014;13(1):115.

93. Paccez JD, Luiz WB, Sbrogio-Almeida ME, Ferreira RCC, Schumann W, Ferreira LCS. Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of Bacillus subtilis as a vector for antigen delivery. Vaccine [Internet]. 2006 Apr 5 [cited 2017 Nov 19];24(15):2935–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16503367

94. Huang JM, Hong HA, Van Tong H, Hoang TH, Brisson A, Cutting SM. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. Vaccine. 2010;28(4):1021–30.

95. De Souza RD, Batista MT, Luiz WB, Cavalcante RCM, Amorim JH, Bizerra RSP, et al. Bacillus subtilis spores as vaccine adjuvants: Further insights into the mechanisms of action. PLoS One. 2014;9(1).

96. Liang J, Fu J, Kang H, Lin J, Yu Q, Yang Q. The stimulatory effect of TLRs ligands on maturation of chicken bone marrow-derived dendritic cells. Vet Immunol Immunopathol. 2013 Sep;155(3):205–10.

97. Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. Nature. 2004 Jul;430(6996):257–63.

98. Takeda K, Akira S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. Vol. 6, Genes to Cells. 2001. p. 733–42.

99. Barnes AGC, Cerovic V, Hobson PS, Klavinskis LS. Bacillus subtilis spores: A novel microparticle adjuvant which can instruct balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. Eur J Immunol. 2007;37(6):1538–47.

100. Rodrigues JF, Mathias-Santos C, Sbrogio-Almeida ME, Amorim JH, Cabrera-Crespo J, Balan A, et al. 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. 2011;286(7):5222–33.

101. Edelhoch H. Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins. Biochemistry. 1967;6(7):1948–54.

102. Tavares MB, Souza RD, Luiz WB, Cavalcante RCM, Casaroli C, Martins EG, et al. Bacillus subtilis Endospores at High Purity and Recovery Yields: Optimization of Growth Conditions and Purification Method. Curr Microbiol [Internet]. 2013 Mar 27 [cited 2017 Nov 19];66(3):279–85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23183956

103. LÓPEZ-SOLÍS R, PUENTE M, DURÁN V, MORALES-BOZO I, KEMMERLING U, PARDO R, et al. Characterization of mouse salivary polypeptide secretion after oral administration of pilocarpine. Rev Chil Hist Nat. 2001 Mar;74(1):195–205.

104. Brereton CF, Sutton CE, Ross PJ, Iwakura Y, Pizza M, Rappuoli R, et al. Escherichia coli Heat-Labile Enterotoxin Promotes Protective Th17 Responses against Infection by Driving Innate IL-1 and IL-23 Production. J Immunol. 2011;186(10):5896–906.

105. Aps LRMM, Diniz MO, Porchia BFMM, Sales NS, Moreno ACR, Ferreira LCS. Bacillus subtilis spores as adjuvants for DNA vaccines. Vaccine. 2015;

106. Oliveira-Nascimento L, Caricati ATP, Abdulack-Lopes F, Neves LCM, Caricati CP, Penna TCV, et al. Bacillus atrophaeus inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary rabies vaccine. Vaccine. 2012 May;30(23):3351–4.

107. Ryan EJ, McNeela E, Pizza M, Rappuoli R, O'Neill L, Mills KH. Modulation of innate and acquired immune responses by Escherichia coli heat-labile toxin: distinct pro- and anti-inflammatory effects of the nontoxic AB complex and the enzyme activity. J Immunol [Internet]. 2000 Nov 15 [cited 2017 Nov 19];165(10):5750–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11067933

108. Ryan EJ, Mcneela E, Murphy GA, Stewart H, O'Hagan D, Pizza M, et al. Mutants of Escherichia coli heat-labile toxin act as effective mucosal adjuvants for nasal delivery of an acellular pertussis vaccine: Differential effects of the nontoxic AB complex and enzyme activity on Th1 and Th2 cells. Infect Immun. 1999;67(12):6270–80.

109. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. Vol. 28, Immunity. 2008. p. 454–67.

110. Huang JM, La Ragione RM, Nunez A, Cutting SM. Immunostimulatory activity of Bacillus spores. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008;53(2):195–203.

111. Stasiłojć M, Hinc K, Peszyńska-Sularz G, Obuchowski M, Iwanicki A. Recombinant Bacillus subtilis Spores Elicit Th1/Th17-Polarized Immune Response in a Murine Model of Helicobacter pylori Vaccination. Mol Biotechnol [Internet]. Springer; 2015 Aug [cited 2017 Dec 17];57(8):685–91. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25779639

112. Esparza-Gonzalez SC, Troy AR, Izzo AA. Comparative analysis of Bacillus subtilis spores and monophosphoryl lipid A as adjuvants of protein-based Mycobacterium tuberculosis-based vaccines: Partial requirement for interleukin-17A for induction of protective immunity. Clin Vaccine Immunol. 2014;21(4):501–8.

113. Zhao W, Zhao Z, Russell MW. 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. 2011 Jun;26(3):200–9.

114. Russell MW, Moldoveanu Z, White PL, Sibert GJ, Mestecky J, Michalek SM. Salivary, nasal, genital, and systemic antibody responses in monkeys immunized intranasally with a bacterial protein antigen and the cholera toxin B subunit. Infect Immun. 1996;64(4):1272–83.

115. Smith DJ, King WF, Barnes LA, Trantolo D, Wise DL, Taubman MA. Facilitated intranasal induction of mucosal and systemic immunity to mutans streptococcal glucosyltransferase peptide vaccines. Infect Immun. American Society for Microbiology (ASM); 2001 Aug;69(8):4767–73.

116. Wu HY, Nikolova EB, Beagley KW, Eldridge JH, Russell MW. Development of antibody-secreting cells and antigen-specific T cells in cervical lymph nodes after intranasal immunization. Infect Immun. 1997;65(1):227–35.

117. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI, Koehler G, et al. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. Science. 1994 Apr;264(5158):561–3.

118. Goodrich ME, McGee DW. Effect of intestinal epithelial cell cytokines on mucosal B-cell IgA secretion: enhancing effect of epithelial-derived IL-6 but not TGF-beta on IgA+ B cells. Immunol Lett. 1999 Mar;67(1):11–4.

119. Akhtar M, Qadri F, Bhuiyan TR, Akter S, Rafique TA, Khan A, et al. Kinetics of antibody-secreting cell and fecal IgA responses after oral cholera vaccination in different age groups in a cholera endemic country. Vaccine. 2017;35(2):321–8.

120. Kantele A, Arvilommi H, Kantele JM, Rintala L, Mäkelä PH. Comparison of the human immune response to live oral, killed oral or killed parenteral Salmonella typhi TY21A vaccines. Microb Pathog. 1991;10(2):117–26.

121. Kantele A. Peripheral blood antibody-secreting cells in the evaluation of the immune response to an oral vaccine. In: Journal of Biotechnology. 1996. p. 217–24.

122. Nieminen T, Käyhty H, Virolainen A, Eskola J. Circulating antibody secreting cell response to parenteral pneumococcal vaccines as an indicator of a salivary IgA antibody response. Vaccine. 1998;16(2–3):313–9.

123. Williams AE, Edwards L, Humphreys IR, Snelgrove R, Rae A, Rappuoli R, et al. Innate imprinting by the modified heat-labile toxin of Escherichia coli (LTK63) provides generic protection against lung infectious disease. J Immunol.

2004;173:7435–43.

124. Williams AE, Edwards L, Humphreys IR, Snelgrove R, Rae A, Rappuoli R, et al. Innate imprinting by the modified heat-labile toxin of Escherichia coli (LTK63) provides generic protection against lung infectious disease. J Immunol [Internet]. American Association of Immunologists; 2004 Dec 15 [cited 2017 Nov 30];173(12):7435–43. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585869

APÊNDICE

APÊNDICE – Artigo de Periódico

molecular oral microbiology

molecular oral microbiology

Sublingual immunization with the phosphate-binding-protein (PstS) reduces oral colonization by *Streptococcus mutans*

E.L. Ferreira[1,*], M.T. Batista[1,*], R.C.M. Cavalcante[1], V.R. Pegos[1,2], H.M. Passos[1], D.A. Silva[1], A. Balan[1,2], L.C.S. Ferreira[1] and R.C.C. Ferreira[1]

1 Department of Microbiology, Biomedical Science Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil
2 Biosciences National Laboratory (LNBio), Materials and Energy Research Center, Campinas, SP, Brazil

Correspondence: Rita C. C. Ferreira, Department of Microbiology, Biomedical Science Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, SP-05508-900, São Paulo, Brazil Tel.: +55 11 3091 7408; Fax: +55 11 3091 7354; E-mail: ritacafe@usp.br
*Both authors contributed equally to this study.

Keywords: adjuvants; anti-caries vaccines; ATP-binding cassette transporters; oral colonization; *Streptococcus mutans*; sublingual immunization
Accepted 9 October 2015
DOI: 10.1111/omi.12142