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

RESUMO

Passos, H. M. Novas abordagens vacinais contra *Streptococcus 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 P1₃₉₋₅₁₂, 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 enterotoxigênica* (ETEC) como adjuvantes vacinais. A proteína P1₃₉₋₅₁₂ foi obtida por meio de sistema de expressão baseado em linhagem recombinante de *B. subtilis*. As formulações vacinais foram baseadas na coadministração da proteína P1₃₉₋₅₁₂ com os esporos e/ou LTK63 pela via sublingual. Os resultados obtidos demonstraram 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 P1₃₉₋₅₁₂ + 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 P1₃₉₋₅₁₂, 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 P1₃₉₋₅₁₂ protein was obtained using a recombinant *B. subtilis* strain. Vaccine formulations were based on the co-administration of the P1₃₉₋₅₁₂ 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 P1₃₉₋₅₁₂ + 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.

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 dependente 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 anaeróbico 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 fluido 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 glicosiltransferases 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 demonstram 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 demonstraram 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 demonstraram que essa proteína apresenta uma estrutura fibrilar alongada de aproximadamente 50 nm, onde as 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 A₃VP₁ e a porção C-terminal entre as regiões C₁-C₂.
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, conseqüentemente, 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 C₁-C₂, e outro sítio localizado na porção N-terminal que compreende a região A₃VP₁ (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 epítomos 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 P1₃₉₋₅₁₂, 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 epítomos lineares e conformacionais reconhecidos por anticorpos anti-P1 e imunogenicidade elevada (41). Além disso, foi demonstrado que o uso da proteína P1₃₉₋₅₁₂ como antígeno vacinal em estratégias por via parenteral e de mucosa estimulou repostas 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 infecciosos (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 efector 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 efectoras 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, demonstrou 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 surfactantes, 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 toxicidade 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 dentro 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 toxicidade, enquanto que a subunidade B composta por 5 polipeptídeos idênticos (11,5 kDa cada monômero) 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 pentamérica). 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 resposta 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 demonstraram 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 P1₃₉₋₅₁₂ 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 P1₃₉₋₅₁₂ administradas pela via sublingual.

6 CONCLUSÕES

- A proteína P1₃₉₋₅₁₂, 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 P1₃₉₋₅₁₂ + LTK63.
- A administração da proteína P1₃₉₋₅₁₂ 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 fluoride – 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.html.

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 *Streptococcus 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>