DALVA ADELINA DA SILVA

Desenvolvimento de uma estratégia vacinal dose-reforço heterólogo baseada em linhagens recombinantes de *Baciilus subtilis* para controle do *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

DALVA ADELINA DA SILVA

Desenvolvimento de uma estratégia vacinal dose-reforço heterólogo baseada em linhagens recombinantes de *Baciilus subtilis* para controle do *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.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. 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)

Silva, Dalva Adelina da
Desenvolvimento de uma estratégia vacinal dose-reforço heterólogo baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis* para controle do *Streptococcus mutans* / Dalva Adelina da Silva.
Orientador: Profª Drª Rita de Cássia Café Ferreira Café Ferreira. -- São Paulo, 2017.
84.p.

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 inglês: Development of a heterologous reinforcement dose vaccine strategy based on recombinant strains of *Bacillus subtilis* for the control of *Streptococcus mutans*.

1. *Streptococcus mutans*. 2. Cárie dental. 3. Vacinas de mucosa. 4. *Bacillus subtilis*. 5. Imunização sublingual 6. Regime dose-reforço heterólogo. I. Café Ferreira, Profª Drª 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): **Dalva Adelina da Silva**

Titulo da Dissertação/Tese: Desenvolvimento de uma estratégia vacinal dose-reforço heterólogo baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis* para controle do *Streptococcus mutans.*

Orientador: Profª 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: .....

ICB USP

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 "***Desenvolvimento de uma estratégia vacinal "prime-boost" baseado em linhagens recombinantes de Bacillus subtilis para controle da cárie dental humana***", registrado sob o protocolo nº ***86/2015***, 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 "***Development of a vaccinal strategy prime-boost based on recombinant strains of Bacillus subtilis to control the human dental caries***", protocol nº ***86/2015***, 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	270

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

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-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.168.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **086/2015/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 ***Dalva Adelina da Silva,*** foi alterado para "***Desenvolvimento de uma estratégia vacinal dose-reforço heterólogo baseada em linhagens recombinantes de Bacillus subtilis para controle do streptococcus mutans***" por solicitação da banca de qualificação.

São Paulo, 05 de setembro de 2017.

Luciane Valéria Sita

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

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Adelina e Abenício, pelo grande poio,

amor e incentivo em todas as etapas

A todos os meus irmãos, pelo apoio, amor e carinho.

E a Deus pela sua presença em minha vida.

Pela proteção e por está sempre me guiando

para o melhor caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pela benção de chegar até aqui, por ter me dado forças e iluminado o meu caminho em toda trajetória, permitindo a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, Adelina e Abenício, pelo apoio, incentivo, humildade, amor, e por terem acreditado na minha capacidade, demonstrando um grande empenho no investimento e colocando sempre em primeiro lugar os meus estudos. Vocês são tudo em minha vida.

Ás minhas irmãs, Maria e Arlete, por todo apoio prestado, além de irmãs, me acolheram com amor de mãe, amiga, com muito carinho. Vocês são muito especiais para mim e foram pessoas fundamentais nesta conquista.

Aos meus irmãos, Juraci, Gildasio, Gilmar e Josemir, pelo apoio, amor, pelas palavras de incentivo e por sempre acreditarem em mim. Vocês são tudo para mim.

Aos meus cunhados, Leone e Róbério, pelo grande apoio que me deram, pelo incentivo, pela recepção, e pelas alegrias. Obrigada por tudo.

Aos meus estimados sobrinhos, Tamili, Cauan, Kauane Vitória, que além de sobrinha, ganhei como afilhada e a bebê mais fofa, Gabrielly. Vocês são minhas alegrias, amo muito, como se fossem meus filhos.

Á profa. Rita de Cássia Café Ferreira, pela oportunidade concedida, por me aceitar como aluna e pela recepção no seu laboratório. Obrigada, pelos conselhos, pela alegria transmitida e por compartilhar conhecimento.

Ao prof. Luís Carlos, pela recepção no laboratório, pelos ensinamentos, por compartilhar suas experiências na pesquisa, pelas discussões dos trabalhos, e pela grande colaboração para o direcionamento deste projeto.

Aos caros colegas do grupo denominado “Strepto/ Bacillus”. Ao prof. Wilson Barros, pelo apoio inicial nos procedimentos de bancada e conhecimento. A Dra. Milene, pela recepção, pelos ensinamentos para continuação do meu aprendizado e pelos conselhos. Aos demais integrantes do grupo, Ewerton, pela sua amizade e alegria. Rafael, Renata, Gisela, Marco, Nayara, Fagner, Lukas e às alunas de odontologia, Carol

e Tamires. Obrigada a todos pelas ideias compartilhadas, discussões de artigos e trabalhos.

Á toda minha família, tios, primos, padrinhos, amigos, da Bahia e também de São Paulo. Obrigada pelas palavras de ânimo e pela grande torcida que fazem por mim.

Ao meu primo que considero como irmão, Leodimar, pelo grande apoio, sempre me incentivou a estudar, por ser meu amigo de todas as horas, sempre me direcionando com os melhores conselhos para seguir um bom caminho em todas as áreas da minha vida. Obrigada, Má! Pelo carinho, consideração, e a confiança que você tem por mim.

Á minha prima, Leonice, que sempre esteve comigo nas batalhas pelos estudos, mesmo a distância, ela continua me apoiando, incentivando e mostrando sua torcida e confiança por mim. Obrigada, prima! Considero você como uma irmã.

Á minha prima irmã, Lucinete, pelo incentivo nos estudos, pelo companheirismo, amizade e alegrias.

Ao meu grande amigo, Adriano Viana, por nunca me abandonar, mesmo a distância nossa amizade continuou firme e forte, sempre me incentivando e me apoiando, seja nas horas tristes ou alegres, você sempre está presente. Obrigada, Adriano, pelos bons conselhos, pela alegria transmitida e por fazer parte da minha vida com essa bela e amável amizade.

Ao meu amigo irmão, Lennon, pelo imenso apoio, amizade sincera, companheirismo, e alegrias. Eu me impressiono muito com a sua humildade, por estar sempre disposto a compartilhar conhecimento. Nunca mediu esforços para me ensinar no que eu tinha dúvidas, nos experimentos, nos trabalhos. Você esteve sempre presente, nas alegrias, tristezas, sempre me dizendo palavras de incentivo e me mostrando que eu posso ser capaz. Você é um exemplo de pessoa, é um profissional admirável. Obrigada, Lennon! Por tudo.

Á Hélic, além de colega de profissão, colega de república desde a faculdade, você é um presente que ganhei de Deus como amiga e como irmã. Você é uma pessoal admirável, Hélic, nunca conheci pessoa tão cativante, sempre incentivadora, carinhosa, simples e muito alegre. Me ajudou muito nos experimentos deste trabalho e me fez sorrir muito durante a manipulação com os animais com o seu grande medo de

camundongos. Obrigada por tudo, pelos momentos de alegrias e vitórias que compartilhamos, pelo consolo nos momentos tristes, pelas orações e incentivo a buscar a Deus, e pelos puxões de orelhas também, que você me dava quando merecia. Agradeço muito a Deus por ter colocado você na minha vida. Você mora no meu coração, Heliquinha.

Á Enes, minha grande amiga, que considero como minha mainha também, quando eu estava alegre você estava alegre, quando eu estava triste você demonstrava tristeza também, sempre pedindo a Deus em suas orações pela minha proteção, pelo meu socorro nas horas difíceis e pela minha vitória. Obrigada, Eninha, pelo seu amor, carinho e pela sua torcida pelo meu sucesso.

Á minha grande amiga, Nailma, pelos bons momentos que passamos juntas desde o período da graduação e que nunca deixou nossa amizade morrer mesmo com a grande distância que o destino nos colocou. Obrigada, Nai, pelo companheirismo, pela sua amável amizade e pela torcida por mim.

Á Deni, pela amizade, incentivo, conselhos, pela humildade e disposição em ajudar na progressão dos trabalhos dos colegas. Você é um grande exemplo. Muito prestativa, sempre procurava um jeitinho na sua agenda de experimentos para ajudar nos meus. Muito obrigada, Deni.

Á Luana, por compartilhar conhecimento experimentais, pelo apoio e incentivo, pela ajuda e direcionamento dos experimentos para o andamento deste projeto. Obrigada, Luana.

Aos amigos baianos, Rubéns, Robert, Natiely, Mariangela, Patrícia, Jamille Karine, Mariane e Raíza. Obrigada por me fazer sentir em casa. Aos colegas paulista do laboratório, Mariana de Diniz, Mariana Cintra, Bruna, Carol, Carina, Juliana, Laís, Sara, Mônica, Naína e Roberta.

Ao apoio técnico, Eduardo Gimenes pela grande ajuda nas questões rotineiras do laboratório, pela paciência, por sua dedicação e humildade em ajudar as pessoas. A Carol pelo apoio técnico na rotina do laboratório.

Aos meus amiguinhos da república Angel, Bianca, Samuel, Aléxia, Tacita e Taiana. Obrigada por todos os momentos juntos, pelas alegrias, pelos consolos nos momentos tristes, pelas comidas baiana que fizemos juntos, pelo apoio, por compartilhar conhecimento, pelas surpresas de aniversário, em fim, por tudo. Com vocês eu me senti em São Paulo e ao mesmo tempo convivendo com a Bahia. Obrigada por fazerem parte da minha vida. Vocês são minha segunda família.

Á Gisele Pereira, pela paciência, dedicação, agilidade, e pela grande ajuda na resolução de várias questões da pós-graduação. Você é uma excelente profissional, muito obrigada por tudo.

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).

“Deus quer, o homem sonha, a obra se realiza”

Fernando Pessoa

RESUMO

SILVA, D. A. **Desenvolvimento de uma estratégia vacinal dose-reforço heterólogo baseada em linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis* para controle do *Streptococcus mutans*.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A cárie dental é uma doença bacteriana infecciosa considerada como um dos principais problemas de saúde pública. O principal agente etiológico para o desenvolvimento da doença é o *Streptococcus mutans*. A proteína P1, também conhecida como antígeno I/II, do *S. mutans* é fundamental para a etapa inicial de adesão à superfície dental (sacarose-independente), sendo, portanto, considerada essencial para o processo de colonização deste patógeno. Algumas regiões dessa proteína vêm sendo empregadas como antígenos em estratégias vacinais contra a cárie, entre elas a região A, localizada na porção N-terminal, conhecida como região de ligação à saliva *Saliva Binding Region* (SBR). No entanto, apesar dos avanços, não existe vacina para a prevenção da cárie licenciada para uso em humanos. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento e caracterização de uma nova estratégia vacinal contra o *S. mutans* baseada em esquema de dose-reforço heterólogo, utilizando o fragmento $P1_{39-512}$, na forma de proteína purificada, expressa a partir de linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis*. A proteína $P1_{39-512}$ compreende os aminoácidos 39-512 da proteína nativa, o que corresponde a toda região A e uma pequena porção da região variável da proteína P1. Utilizamos esporos de *B. subtilis* 1012, modificados para expressar o antígeno $P1_{39-512}$ ($LDV702_{)}$. A linhagem LDV704, além de expressar o antígeno, foi modificada para expressar uma invasina (InvA) com capacidade de se ligar a epitélios de mucosa. Camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados por via sublingual com uma dose de esporos de *B. subtilis* (linhagens 1012, LDV702, LDV704 ou PBS) seguidos por dois reforços com a proteína $P1_{39-512,}$ associada ou não com o adjuvante LTK63. Níveis significativos de anticorpos séricos foram induzidos pelas formulações em associação com o adjuvante após a terceira dose, e mostraram-se capazes de reconhecer os epítopos em diferentes linhagens de *S. mutans*. No entanto, nenhuma das formulações mostrou-se capaz de ativar respostas de mucosa (S-IgA). Porém, observamos que o adjuvante LTK63 empregado na estratégia dose-reforço heterólogo potencializou a resposta sérica de anticorpos IgG, sendo capaz de modular e melhorar qualitativamente as respostas induzidas. Assim, a administração das formulações na presença do adjuvante representa uma alternativa promissora para o controle do *S. mutans*.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, cárie dental, vacinas de mucosa, *Bacillus subtilis*, imunização sublingual, regime vacinal dose-reforço heterólogo.

ABSTRACT

SILVA, D. A. **Development of a heterologous reinforcement dose vaccine strategy based on recombinant strains of *Bacillus subtilis* for the control of *Streptococcus mutans*.** 84 p. Thesis (Master's Degree in Microbiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2017.

Dental caries is an infectious bacterial disease considered as one of the main public health problems. The main etiological agent for the development of the disease is the *Streptococcus mutans*. The P1 protein, also known as *S. mutans* Ag I / II antigen, is essential for the initial stages of adhesion to the dental surface (sucrose-independent) and is, therefore, considered essential for the colonization process of this pathogen. Some regions of this protein have been used as antigens in vaccine strategies against caries, among them the A region, located at the amino terminal region also known as the Saliva Binding Region (SBR). However, despite the advances, there is no licensed anti-caries vaccine for human use. Therefore, the present work aims to develop and characterize a new vaccine strategy against *S. mutans* based on a heterologous priming/boost immunization regimen using the recombinant $P1_{39-512}$ fragment, expressed and purified from a *Bacillus subtilis* strain. The $P1_{39-512}$ protein comprises amino acids that encompasses the entire A region and a small portion of the variable region of the P1 protein. We used spores of *B. subtilis* 1012 (wild-strain) and recombinants that were modified to express the antigen $P1_{39-512}$ (LDV702). In addition to express the antigen, the LDV704 strain was modified to express a surface-exposed bacterial invasin (InvA) capable of binding to the mucosal epithelia. BALB/c mice were primed via the sublingual route with a dose of *B. subtilis* spores (1012, LDV702, or LDV704 strains) followed by two boosting doses with the purified protein $P1_{39-512}$, associated or not with the LTK63 adjuvant, by the same administration route. Significant serum antibody levels were induced by the formulations with the adjuvants after the third dose and the antibodies were shown to recognize epitopes exposed on the surface of different *S. mutans* strains. However, none of the formulations were capable to activate mucosal responses (S-IgA). Nevertheless, we observed that the LTK63 enhanced the serum IgG responses and qualitatively improved the induced antibody response. Thus, the administration of the formulations in the presence of the adjuvant represents a promising alternative for the control of *S. mutans*.

Key words: *Streptococcus mutans*, dental caries, mucosal vaccines, *Bacillus subtilis*, sublingual immunization, prime-boost immunization regimen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proteína P1 26
Figura 2 - Purificação da proteína $P1_{39-512}$ por cromatografia de afinidade ao níquel. . 43
Figura 3 - Visualização dos esporos de *B. subtilis* 1012 por microscopia de contraste de fase após o processo de esporulação e purificação 44
Figure 4 - Purificação da proteína recombinante LTK63. 45
Figura 5 - Regime vacinal por via de mucosa do bloco 1. 47
Figura 6 - Detecção de anticorpos IgG e seus subtipos (IgG1/IgG2a) $P1_{39-512}$ – específicos presentes no soro dos animais imunizados. 48
Figura 7 - Avaliação da capacidade dos anticorpos $P1_{39-512}$ - específicos se ligarem em epítopos conformacionais ou lineares 49
Figura 8 - Análise do perfil das citocinas IL-6, IFN-γ, IL-10 e IL-17 produzidas por esplenócitos dos camundongos imunizados reestimulados *in vitro*. 50
Figura 9 - Avaliação *in vitro* de linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ produtores de IL-4 ou IFN-γ específicos para $P1_{39-512}$ 51
Figura 10 - Regime vacinal por via de mucosa do bloco 2. 52
Figura 11 - Detecção de títulos de anticorpos IgG e IgG1/IgG2a específicos contra a proteína recombinante $P1_{39-512.}$ 53
Figura 12 - Avaliação da capacidade dos anticorpos $P1_{39-512}$-específicos se ligarem em epítopos lineares 54
Figura 13 - Avaliação da reatividade dos soros dos camundongos imunizados à proteína P1 nativa presente na superfície de linhages de *S. mutans* 55
Figura 14 - Avaliação da avidez dos anticorpos específicos gerados contra a proteína $P1_{39-512}$. 56
Figura 15 - Análise do perfil das citocinas (IL-6, IFN-γ, IL-10 e IL-17) induzidas após o regime vacinal dose-reforço heterólogo de 3 doses 57
Figura 16 - Avaliação *in vitro* de linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ produtores de IL-4 e es IFN-γ específicos para $P1_{39-512,}$ após 16 horas de estimulação *in vitro* dos esplenócitos dos animais imunizados 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens bacterianas *S. mutans* e *B. subtilis* 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	Ammonium-Choride-Potassium
ANOVA	Analysis of variance (Análise de Variância simples)
BSA	Bovine sérum albumin (Albumina do soro bovino)
CBA	Cytometric beads assay
CT	*Cholera toxin* (toxinacolérica)
E. coli	*Escherichia coli*
ELISA	*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)
FDA	*Food and Drug Administration* (Administração de comidas e remédios)
FITC	Fluoresceína
GALT	*Gastrointestinal-associated lymphoid tissue* (Tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal)
GBPs	Proteínas ligadoras de glucanos
Gp340	Glicoproteína 340
GRAS	*Generally regorded as sarfe*
Gtfs	Glicosiltransferases
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INVA	Invasina
IPTG	*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (isopopil β-D-1tiogalactopiranosideo)
LB	Meio Luria-Bertani
LPS	Lipolissacarídeo
NALT	Tecido linfoide associado à mucosa nasal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	*O*-Phenylenediamine
PAGE	*Polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de Poliacrilamida)

PAMPs	*Pathogen-associated molecular pottern molecules* (Padrões moleculares associados aos patógenos)
PBS	*Phosphatase buffered saline* (Solução salina tamponada)
PMSF	*Phenylmethanesulfonylfluoride*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute Medium*
SBR	*Saliva-Binding Region* (Região de Ligação a Saliva)
SDS	Sodiumdodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE	Sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
S-IgA	IgA secretada
TB	*Terrific Broth*
Th	T *help*
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
$D.O_{600nm}$	Densidade ótica a 600 nanômetros
L	Litro
M	Molar
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Ng	Nanograma
Pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
kDa	Quilodalton
Kg	Muilograma
µL	Microlitro
Mg	Micrograma
%:	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1.1 A cárie dental e o *Streptococcus mutans* 22

1.2 Antígenos vacinais contra a cárie dental 23

1. 3 Resposta protetora e vias de mucosa 26

1.4 Veículos vivos vacinais 27

2 OBJETIVOS 32

2.1. Objetivo geral 33

2.2. Objetivos específicos 33

3 MATERIAL E MÉTODOS 34

3.1 Linhagens bacterianas empregadas 35

3.2 Expressão e purificação da proteína recombinante $P1_{39-512}$ 35

3.3 Expressão e Purificação da proteína LTK63 36

3.4 Produção dos esporos recombinantes de *B. subtilis* 37

3.5 Protocolo vacinal e processamento das amostras 38

3.6 Análise da resposta humoral induzida após ensaio de imunização 39

3.7 Ensaio de avidez dos anticorpos específicos para a proteína $P1_{39-512}$ 40

3.8 Análise da resposta celular induzida após a vacinação 40

3.9 Análises estatísticas 41

4 RESULTADOS 42

4.1 Expressão e purificação da proteína recombinante $P1_{39-512}$. 43

4.2 Obtenção dos esporos de *B. subtilis* 44

4.3 Purificação da proteína recombinante LTK63 44

4.4 Regime de imunização 46

4.5 Bloco1: Avaliação da imunogenicidade da proteína recombinante $P1_{39-512}$ após o regime vacinal dose-reforço heterólogo administrado pela via sublingual 46

4.5 Avaliação da reatividade dos soros de animais imunizados contra epítopos conformacionais e lineares presentes na proteína recombinante $P1_{39-512}$ 48

4.6 Determinação do perfil de citocinas produzidas nos animais imunizados 49

4.7 Avaliação de respostas celulares induzidas pelos regimes vacinais 50

4.8 Bloco 2: Avaliação da incorporação do adjuvante LTK63 ao regime de imunização dose-reforço heterólogo 51

4.9 Reatividade dos soros anti-P1$_{39-512}$ contra epítopos conformacionais e lineares presentes na proteína recombinante P1$_{39-512}$ 54

4.10 Avaliação da efetividade dos anticorpos gerados pelas formulações vacinais no reconhecimento da proteína P1 na superfície em diferentes linhagens de *S. mutans* **55**

4.11 Determinação da avidez dos anticorpos gerados ao antígeno recombinante P1$_{39-512}$ 56

4.12 Avaliação de citocinas 56

4.13 Avaliação da resposta imune celular P1$_{39-512}$ específica 58

5 DISCUSSÃO 60

6 CONCLUSÕES 67

REFERÊNCIAS* 69

APÊNDICE 83

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cárie dental e o *Streptococcus mutans*

A cárie é uma doença oral de caráter crônico e infeccioso, definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um dos principais problemas de saúde pública no mundo (PETERSEN, 2003; WORSLEY et al., 2016). Essa doença atinge países subdesenvolvidos ou mesmo aqueles mais desenvolvidos, sendo as populações mais desfavorecidas as mais afetadas. Os principais grupos afetados são crianças na fase escolar e, em países industrializados, cerca de 60 a 90% desse grupo populacional é atingido assim como a maior parte dos adultos (PETERSEN, 2003; TAUBMAN; NASH, 2006). A cárie dental resulta do processo de descalcificação do tecido rígido do dente, ocasionado pela presença de ácidos gerados por bactérias fermentadoras existentes no biofilme dental. A evolução clínica da doença está relacionada com a associação de vários fatores incluindo hábitos do hospedeiro, dieta rica em carboidratos bem como, a microbiota oral com predominância em espécies cariogênicas, esse conjunto de fatores associados com o tempo, acarreta no estabelecimento e geração da cárie dental (IDONE et al., 2003; TAUBMAN; NASH, 2006; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009; KOO et al., 2010; HUIMIN, 2013).

Vários microrganismos orais estão envolvidos na formação da placa dental, dentre os quais, bactérias do gênero *Streptococcus* são consideradas percussoras no desenvolvimento da doença, sendo a espécie, *Streptococcus mutans* um dos patógenos mais identificados em isolados clínicos de lesões cariosas. *S. mutans* é uma bactéria gram-positiva com formato de coco que tem como habitat natural a cavidade oral humana. Esse patógeno dispõe de características fisiopatológicas únicas, como a eficiência em aderir à superfície dental bem como a capacidade de produzir ácidos e de sobreviver em ambiente ácido, que o torna um dos principais agentes etiológicos da cárie dental em humanos (BANAS, 2004; TAUBMAN; NASH, 2006; KOO et al., 2010; LEMOS et al., 2013).

Uma vez que o *S. mutans* foi isolado e identificado como o principal agente etiológico para o desenvolvimento da cárie dental em humanos (JORDAN; KRASSE; MÖLLER, 1968; LEHNER et al., 1981; CLARK; HIRST; JEPSON, 1998), medidas preventivas incluindo a remoção da placa dental, uso do flúor em água potável e em produtos de higiene, tem sido empregadas para controle do patógeno (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000; LEVINE; OWEN; AVERY, 2005).

Embora tenha reduzido os números de casos da doença na população, esses tratamentos possuem um custo muito alto e a implementação dessas práticas em populações de baixa renda os tornam inviáveis. (BANAS, 2004; TAUBMAN; NASH, 2006; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009).

1.2 Antígenos vacinais contra a cárie dental

A concepção de vacinas conta a cárie dental foi estabelecida antes mesmo da descoberta do *S. mutans* como agente primário para o desenvolvimento da placa dentária (CHALLACOMBE; CALDWELL, 1980). A vacinação constitui o método preventivo mais adequado para controle dessa doença. Entretanto, ainda não existe nenhuma vacina licenciada disponível para humanos que atue na prevenção contra essa infecção (HUIMIN, 2013). Em diversos estudos, o principal alvo empregado nas estratégias tem sido o mecanismo primário de adesão utilizado pelo *S. mutans* (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000; ZHANG, 2013).

A aderência do *S. mutans* a superfície dental constitui o primeiro passo para o estabelecimento da cárie dental. Esse processo ocorre essencialmente em duas etapas. A primeira etapa consiste na ligação entre a proteína P1 também denominada de antígeno I/II, antígeno B, ou PAc a receptores glicoproteicos, como a glicoproteína 340 (gp340), que se encontram dispostos na película adquirida adsorvida ao dente. Esse, primeiro estágio é independente de sacarose, e considerado reversível. Por outro lado, a segunda etapa, trata-se de um processo complexo e irreversível, o qual necessita de sacarose para a produção de polissacarídeos extracelulares (glucanos), que uma vez formados interagem com as proteínas de superfícies do patógeno, como as proteínas ligadoras de glucanos (Gbps) e as glicosiltransferases (GtfBs) que tem por consequência depósito de massa bacteriana na superfície do o dente, gerando o biofilme dental (BANAS, 2004; TAUBMAN; NASH, 2006; BRADY et al., 2010; KOO et al., 2010). Uma das primeiras estratégias vacinais desenvolvidas contra a cárie dental ocorreu na década de 1970 onde vários pesquisadores (TALBMAN; SMITH, 1974; MCGHEE et al., 1975) empregaram como antígeno alvo, o patógeno inteiro (*S. mutans)* por via subcutânea ou glândulas salvares em modelos murinos, com a finalidade de desenvolver uma resposta protetora contra a doença. Os resultados obtidos por esse tipo de imunização foram promissores uma vez que foram capazes de reduzir de forma significativa a colonização oral pelo *S. mutans*. Porém outras pesquisas evidenciaram que essa estratégia poderia induzir

anticorpos com reatividade cruzada com fibras cardíacas de humanos e também de coelho (VAN DE RIJN; BLEIWEIS; ZABRISKIE, 1976; HUGHES et al., 1980). Sendo assim, para a continuação das buscas por novas estratégias o foco principal das vacinas contra a cárie passou a ser restrito a proteínas, fragmentos ou peptídeos originários dos principais fatores de virulências do *S. mutans* envolvidos no mecanismo de patogenicidade, em especial aqueles derivados da proteína P1 que participa da primeira etapa da colonização (BRADY et al., 2010; ZHANG, 2013).

A proteína P1 do *S. mutans* possui 185 kDa e é considerada a maior proteína adesiva existente na superfície deste patógeno. Esse antígeno também se encontra distribuído em todos estreptococcos orais como também, foi identificado em outras espécies não orais, como *S. pyogenes* e *S. agalactiae* (MA et al., 1990; BRADY et al., 1992; JENKINSON; DEMUTH, 1997). Ao longo de toda a sequência primária dessa proteína são identificadas seis regiões. A primeira delas corresponde a um peptídeo sinal, em seguida encontra-se uma região rica em alanina, referida como região A. Uma região P rica em prolina, uma sequência transmembrana e um motivo LPXTG para ancoragem da proteína a parede celular, e, além disso, existe também uma poção V denominada região variável que se encontra localizada entre as regiões A e P onde existe maior variabilidade da sequência da proteína P1 entre as espécies de *S. mutans.* A forma terciária dessa proteína possui uma estrutura fibrilar alongada com o tamanho aproximado de 50 nm. Nessa estrutura a região A está disposta em α-hélice entrelaçada com a região P, também uma α-hélice, e na extremidade superior se encontra a região V que se dobra em forma globular (**Figura 1 B**). (BRADY et al., 1992; HAJISHENGALLIS; KOGA; RUSSELL, 1994; SULLAN et al., 2015).

Ao longo de várias décadas, diversos estudos realizados em modelos animais (primatas não humanos e murinos) demonstraram o potencial antigênico da proteína P1 de *S. mutans* em ensaios de imunizações ativa contra a cárie. Em muitos desses estudos, foi verificado que a geração de anticorpos protetores direcionados contra a adesina P1 leva ao bloqueio do processo de adesão e, consequentemente, a prevenção do desenvolvimento da cárie dental. O efeito protetor dos anticorpos gerados por esses ensaios foi também evidenciado por meio de imunizações passivas, em primatas não humanos e também em testes clínicos. Nesses estudos verificou-se uma redução da colonização do patógeno na superfície do dente por um longo período. Isso demonstra a relevância da utilização dessa proteína como candidato promissor em estratégias

vacinais contra a cárie (LEHNER; CHALLACOMBE; CALDWELL, 1980; LEHNER et al., 1981; TAUBMAN; NASH, 2006; ROBINETTE et al., 2011).

Além do antígeno P1 inteiro, outros pesquisadores resolveram investir em regiões específicas dessa proteína, conhecidos como sítios ou domínios de ligação. Um desses sítios compreende a região A, essa porção é formada por três sequências repetidas de alanina, duas completas e uma incompleta e se encontra localizada na porção amino-terminal da proteína P1 (CROWLEY et al., 1993; HAJISHENGALLIS; KOGA; RUSSELL, 1994; MOISSET et al., 1994; LARSON et al., 2010). Essa porção foi denominada região de ligação à saliva (*Saliva-Binding Region* – SBR) engloba um sítio de ligação a receptores presente na saliva. Esse fragmento é considerado uma das sequências de extrema importância no processo inicial de adesão do patógeno na película salivar aderida ao dente, e consequentemente, no desenvolvimento da cárie dental. Desta forma, vários estudos têm investido nessa região como possível candidato em estratégias vacinais contra a cárie dental (NAKAI et al., 1993).

A SRB quando empregada em ensaios de imunização por via de mucosa se mostrou um potente antígeno vacinal com geração de imunidade protetora contra a cárie dental (HAJISHENGALLIS; RUSSELL; MICHALEK, 1998). Mais tarde, Huang e colaboradores (2001), utilizando o mesmo fragmento expresso em *Salmonella* foi capaz de induzir respostas sistêmicas e de mucosa efetivas contra o *S. mutans* (HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2001).

Em estudos recentes desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, um fragmento derivado da porção amino terminal da proteína P1 foi caracterizado quanto às suas propriedades imunológicas e indicado como candidato alvo em estratégias vacinais contra a cárie. Esse fragmento abrange toda a região A rica em alanina e uma pequena fração variável (região V) que engloba os aminoácidos de 39-512 e foi denominado como $P1_{39\text{-}512}$ (**Figura 1 A**) (TAVARES et al., 2010). Em outros estudos, o emprego do fragmento $P1_{39\text{-}512}$ ou a SBR, coadministrada a moléculas imunomoduladoras flagelina, alúmen, toxina termolábel (LT), toxina colérica (CT) e derivados de ambos em imunizações por via de mucosa (oral ou nasal), foi capaz de induzir respostas humorais sistêmicas e de mucosa contra cárie (BATISTA et al., 2014; HAJISHENGALLIS et al 1998; LEHNER ; RUSSELL; 1978; MICHALEK, 1998).

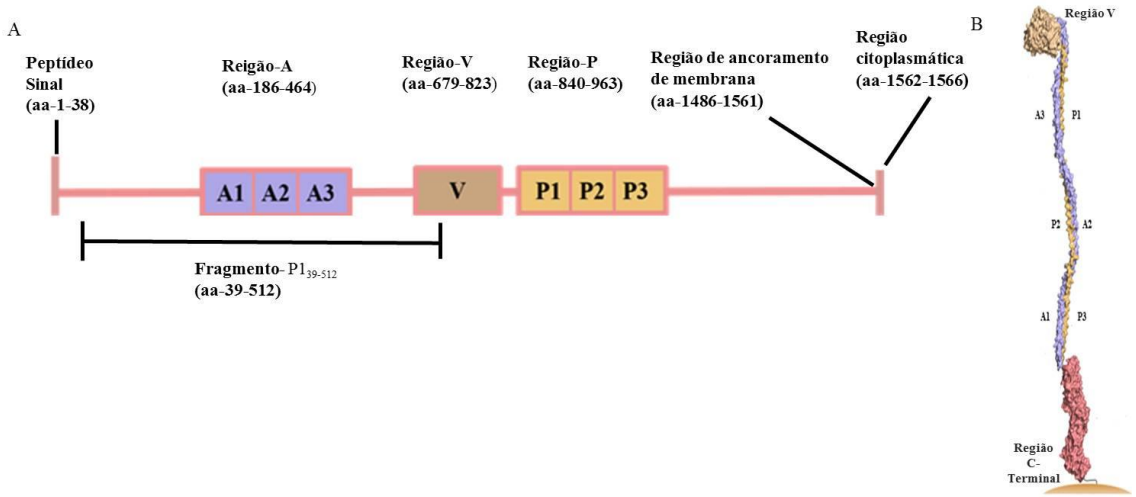


Figura 1 - Representação esquemática da proteína P1. Sequência primária da proteína P1 de *S. mutans*, demonstrando as seis regiões distintas que compreendem essa proteína. Em destaque, o fragmento $P1_{39-512}$ (A). Estrutura terciária da proteína P1 contendo seus principais domínios (B).

Fonte: Ambas as figuras foram modificadas dos esquemas desenvolvidos por (ROBINETTE et al., 2011, 2014)

1. 3 Resposta protetora e vias de mucosa.

O conhecimento prévio do tipo de resposta específica contra agentes patogênicos é de extrema importância para o desenvolvimento de uma vacina efetiva. Pois, dependendo do tipo de resposta protetora, a administração de vacinas será eficaz quando essas forem administradas em locais referidos como porta de entrada do patógeno. Sabe-se que o tipo de resposta imune requerida para a proteção contra a cárie dental é principalmente aquela que envolve a produção de IgA secretor (S-IgA). Outro tipo de resposta também associada à proteção contra a cárie é o IgG, proveniente do fluído crevicular gengival. Ambas as respostas (IgA de mucosa e IgG) quando induzidas têm acesso direto à superfície dental e são capazes de interferir no processo de adesão, como por exemplo, o bloqueio da ligação das proteínas adesivas ao dente. Após o conhecimento da resposta protetora e os mecanismos de patogenicidade do *S. mutans* no desenvolvimento da cárie, as vias de entregas de vacinas contra esse patógeno passaram a ser repensadas, dando prioridade às vias de mucosa, como as vias oral, nasal e, mais recentemente a via sublingual (LEHNER; CHALLACOMBE; CALDWELL, 1980; RUSSELL; CHALLACOMBE; LEHNER, 1980; MICHALEK; CHILDERS, 1990; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009; FERREIRA et al., 2016).

A entrega de vacinas por vias de mucosa constitui um meio eficaz para indução de respostas imune protetora contra diferentes doenças infecciosas, cuja patogenicidade

se inicia em regiões da mucosa. Ao contrário das vias parenterais, as vias de mucosa são capazes de estimular respostas especificas locais consideradas importantes para o bloqueio da entrada dos patógenos, como a secreção de IgA, mas também respostas sistêmicas. As estratégias vacinais de mucosa envolvem processos não invasivos, além disso, a entrega de vacinas por essa via oferece várias vantagens ao paciente, como a ausência de dor ou incômodo durante os procedimentos. Essa via também evita os riscos de transmissão de doenças durante os procedimentos de inoculação e não há necessidade de um profissional treinado para aplicação, logo há uma maior aceitabilidade por parte da população (LINTERMANS, P.; DE GREVE, 1995; LAVELLE; O'HAGAN, 2006). Entretanto, vacinas de subunidades empregando fragmentos específicos de um patógeno, como a P1, têm como característica uma reduzida imunogenicidade quando administrada por via de mucosa. Isso ocorre devido à perda de moléculas imunoestimulatórias conhecidas como PAMPs (do inglês "Pathogen-associated molecular pattern molecules") que estão naturalmente presentes na estrutura do patógeno e são importantes para ativação de células do sistema imunológico (LAVELLE; O'HAGAN, 2006). Além disso, esses antígenos quando em ambientes de mucosas podem ser degradados ou mal absorvidos/processados pelas células imunológicas locais.

1.4 Veículos vivos vacinais

Um método alternativo para a entrega de antígenos é a utilização de veículos vacinais vivos empregando microrganismos geneticamente modificados, incluindo vírus, leveduras ou bactérias (RUSSELL; CHALLACOMBE; LEHNER, 1980; LINTERMANS, P.; DE GREVE, 1995; WELLS et al., 1996; LILJEQVIST et al., 1999). A maioria dos vetores utilizados para entrega de antígenos por vias de mucosa exercessem funções como a proteção do antígeno durante o tráfego gastrointestinal ou vias respiratórias, direcionamento do antígeno alvo para locais específicos na mucosa, ou até mesmo atuar como adjuvantes (LINTERMANS, P.; DE GREVE, 1995; APS et al., 2015). Em se tratando do emprego de bactérias recombinantes como vetores de entrega de antígenos, espécies bacterianas referidas como patogênicas atenuadas incluindo *Salmonella*, *Literia monocytogenes*, *M.bovis*, *Micobacteriumtuberculosis*, foram bem sucedidas e utilizadas em estratégias vacinais ao longo do tempo (LINTERMANS, P.; DE GREVE, 1995). No entanto, esses modelos de entrega de

antígenos podem possibilitar a reversão da atenuação, sendo assim necessário a busca por modelos mais seguros. A utilização de bactérias não patogênicas como o *Lactobacillus* spp., *Lactococus lactis,* e o *Bacillus subtilis,* se destaca como um dos modelos que oferecem vantagens de uso em estratégias vacinais (WELLS et al., 1996; ISTICATO et al., 2001; DUC et al., 2003).

B. subtilis é um bacilo gram-positivo, não patogênico e formador de esporos, considerado a forma de vida mais resistentes do planeta. É classificada como uma espécie segura, sendo nomeada com status de GRAS (do inglês "*generally regorded as sarfe"*) pelo FDA americano. Os esporos de *B. subtilis* possuem um histórico relevante em várias áreas de pesquisa, sendo utilizados na indústria para produção de enzimas, bioindicadores em processos de esterilização, além de serem comercializados como probióticos para humanos e animais domesticados. Linhagens de *B. subtilis* são candidatas ao desenvolvimento de estratégias vacinais, seja na produção de antígenos recombinantes ou como veículo vacinal para a entrega de antígenos, que podem ser expressos tanto na forma vegetativa (no meio intracelular) quanto na forma de esporos (fusionado à proteínas nativas da capa do esporo). Na produção de proteínas heterólogas, um dos destaques das linhagens de *B. subtilis* é a ausência da membrana externa, assim, toda proteína secretada pode ser colhida diretamente do meio de crescimento. Outro ponto importante é a ausência de LPS. Logo há uma redução no tempo e também no custo do processo de purificação para obtenção do antígeno alvo. Além disso, com a segurança e a capacidade de esporular, a estocagem, preservação e transportes das vacinas deixam de ser um fator preocupante. Essas características têm despertado o interesse de alguns pesquisadores pela utilização de esporos de *B. subtilis* como candidatos para entrega de antígenos vacinais, principalmente por vias de mucosa (RUSSELL; CHALLACOMBE; LEHNER, 1980; HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2001; DUC et al., 2003; FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005; DE SOUZA et al., 2014)

No início do uso dos esporos de *B. subtilis* como veículo de entrega era possível observar duas estratégias para a expressão dos antígenos alvos. Na primeira delas denominada de modelo "*OUT*", a proteína de interesse é fusionada às proteínas que revestem a superfície da capa do esporo, principalmente à CotB, CotC, ou CotG (ISTICATO et al., 2001; DUC et al., 2003; MAURIELLO et al., 2004). Na segunda estratégia, a proteína alvo é expressa sob o controle de um promotor (PgsiB), sendo produzida quando a bactéria estiver no estágio vegetativo após a germinação do esporo,

estratégia que ficou conhecida como modelo "*IN*" (PACCEZ et al., 2006). Em alguns trabalhos, ambas as estratégias, quando administrados por vias de mucosas, promoveram uma boa apresentação dos antígenos ao sistema imunológico com a indução de anticorpos específicos sistêmicos ou de mucosa (IgA fecal) (DUC et al., 2003; SCHUMANN, 2007; LUIZ et al., 2008). De forma contraditória, em outros trabalhos, a administração *B. subtilis* na forma de esporos ou células vegetativas por via oral demonstrou uma baixa eficiência na ativação da resposta imunológica contra o antígeno alvo carregado (FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005). Uma das explicações para esse fenômeno consiste na rápida passagem dos esporos pelo trato oral, e, por consequência, uma reduzida exposição do antígeno carregado ao sistema imune associado ao trato gastrointestinal (GALT) (TAVARES BATISTA et al., 2014)

Além disso, outra possibilidade que merecem ser ressaltada é a ocorrência da tolerância imunológica devido à frequente exposição aos esporos presente no solo e em alimentos. Uma estratégia desenvolvida para solucionar questões como essas, e que vem demonstrando bons resultados, tem sido o emprego de proteínas bacterianas com propriedades adesivas e específicas para receptores de células presentes no tecido de mucosas (CLARK; HIRST; JEPSON, 1998; CRITCHLEY-THORNE; STAGG; VASSAUX, 2006).

Com base nessas evidências, e com o intuito de melhorar a eficiência de entrega de antígenos vacinais por vias de mucosa, nosso grupo de pesquisa descreveu uma nova estratégia baseada em formas recombinantes de esporos de *B. subtilis* empregando as duas abordagens ("OUT" e"IN") concomitantemente (PACCEZ et al., 2006; BATISTA et al., 2014). Nessa estratégia, os esporos de *B. subtilis* foram manipulados geneticamente para expressar uma proteína adesiva de origem bacteriana (SlpA do *Lactobacillus brevis*) ou a invasina (InvA) de *Yersinia pseudotuberculosis*. Em uma segunda etapa, os esporos de *B. subtilis* foram geneticamente modificados para expressar o fragmento $P1_{39\text{-}512}$ de *S. mutans* após a germinação. Como resultado dessas construções, foi observado que os esporos adesivos de *B. subitilis*, em particular a linhagem expressando a invasina (InvA) denominada de LDV704, persistiram por mais tempo durante a passagem pelo trato gastrointestinal quando administrados por via oral em modelo murino. Além disso, quando esses esporos foram administrados por diferentes vias de mucosa (sublingual e intranasal) foi possível observar um aumento da resposta de anticorpos $P1_{39\text{-}512}$ – específicos (TAVARES BATISTA et al., 2014).

A linhagem LDV704 contém a sequência completa da InvA de *Yersinia pseudotuberculosis.* Essa proteína possibilita a aderência e, em sequência, a internalização da bactéria no meio intracelular, por meio da afinidade de ligação específica a receptores β1 de integrina que estão presentes em superfícies de células M de mucosa (YOUNG; FALKOW; SCHOOLNIK, 1992).

Outra alternativa importante utilizada em estratégias de subunidades é a coadministração dessas formulações a compostos com propriedades imunomoduladoras com capacidade de potencializar ou modular a resposta imunológica contra o antígeno alvo (PULENDRAN; AHMED, 2006). Estes compostos são conhecidos como adjuvante palavra originária do latim "adjuvare" que se refere a "ajudar" (PULENDRAN; AHMED, 2006). A toxina LT (enterotoxina termo-lábil), produzida por algumas linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigência, representa um dos adjuvantes mais potentes coadministrados a antígenos vacinais por vias de mucosa. No entanto, por se tratar de uma molécula tóxica, sua utilização em formulações vacinais voltadas para humanos, torna-se inviável. Desta forma, diferentes mutantes de LT em condições laboratoriais foram produzidos com a finalidade de diminuir o efeito tóxico, porém, mantendo o efeito adjuvante. O mutante LTK63 é um exemplo que apresenta características estruturais da toxina parental, mas sua atividade enzimática é completamente abolida, tornando-a atóxica. Estudos anteriores demonstraram que o variante atóxico LTK63 é um forte candidato a adjuvante de mucosas, capaz de estimular resposta protetora humoral e celular (PALMA et al., 2008; ERUME; PARTIDOS, 2011).

Embora, as imunizações com os esporos recombinantes, ou a presença de adjuvantes em doses homólogas por vias de mucosa, tenha demonstrado eficiência na ativação de respostas sistêmicas efetivas, essas abordagens ainda se mostram ineficazes na ativação e manutenção de anticorpos protetores, como é o caso do IgA secretória nos sítios de mucosa. Esses episódios consistem nos principais obstáculos evidenciados nas pesquisas para aquisição de uma vacina eficaz contra a cárie dental. Para reverter essas situações, novas abordagens de administrações são necessárias. A estratégia de imunização sensibilização e reforço (prime-boost) heterólogo, descrita inicialmente em 1993, baseia-se na estimulação do sistema imune mediante a administração do antígeno alvo por duas formas distintas, onde na primeira dose "prime" o sistema imune é estimulado por ação do antígeno associado a um vetor e, na segunda dose, o "boost" emprega o antígeno no contexto de uma formulação distinta. Na maioria das vezes essa

estratégia demonstra ser bem mais eficiente para ativação do sistema imune em relação aos regimes homólogos tradicionalmente utilizados em vacinas sensibilização e reforço (LI et al., 1993; LU, 2009).

A estratégia dose-reforço heteróloga, permite a combinação de diversas formas de apresentação do antígeno em um mesmo regime vacinal, (HU et al., 1992; LASARO et al., 2005; DE ALENCAR et al., 2009; RIGATO et al., 2011) Em trabalho realizado por Ciabattini e colaboradores (2004), um regime vacinal do tipo "prime-boost" heterólogo, cujo "prime" foi realizado com esporos de *B. subtilis* como veículo vacinal vivo, capaz de expressar o fragmento C da toxina tetânica por via de mucosa oral, e o "boost" consistia na administração do mesmo antígeno em sua forma purificada, por via parenteral (subcutânea) resultou em respostas imunológicas antígenos-específicas locais e sistêmicas compatíveis com o correlato de proteção previsto para esta toxina. Apesar de promissor, o regime "prime-boost" heterólogo ainda não foi explorado com antígenos recombinante da proteína P1 de *S. mutans*, e poderia ser uma boa alternativa para entrega dos antígenos por vias de mucosa em estratégias vacinais contra a cárie.

Com base no exposto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar uma nova estratégia vacinal de mucosa do tipo "prime-boost" heterólogo contra o *S. mutans*. Nessa estratégia utilizamos como antígeno alvo a proteína recombinante $P1_{39-512}$, sendo ela administrada na forma de esporos de *B. subtilis* e na forma de proteína purificada na presença ou ausência do adjuvante LTK63 por via sublingual.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar uma nova estratégia vacinal em esquema dose-reforço heterólogo por via de mucosa, empregando como estímulo inicial os esporos de *B. subtilis*, capazes de expressar a proteína recombinante $P1_{39-512}$ e a proteína $P1_{39-512}$ purificada, como reforço, com ou sem a associação do adjuvante LTK63.

2.2. Objetivos específicos

I. Expressão da proteína recombinante $P1_{39-512}$, utilizando o sistema de expressão baseado na linhagem de *B. subtilis* LDV701, e subsequente purificação da proteína por meio da técnica de cromatografia de afinidade.

II. Expressão e purificação da proteína LTK63, utilizando sistema de expressão baseado em linhagens recombinantes de *E. coli.*

III. Produção dos esporos de *B. subtilis* pela linhagem selvagem 1012 e dos recombinantes LDV702 e LDV704, utilizando a técnica de esporulação por exaustão de nutrientes.

IV. Caracterização das respostas imunológicas induzidas após administração por via sublingual em camundongos fêmeas da linhagem BALB/c.

V. Analisar a funcionalidade dos anticorpos gerados frente ao reconhecimento da proteína nativa expressa na superfície de diferentes linhagens de *S. mutans*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas empregadas

LINHAGENS BACTERIANAS	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIAS
Streptococcus mutans NG8	Linhagem selvagem de *S. mutans*	Li et al. (2001)
*B. subtilis*1012	Linhagem parental de *B. subtilis*	Wehrl; Niederweis; Schumann, 2000.
LDV 701	1012 transformada com vetor pLDV 701	Tavares et al. 2010
LDV 702	1012 transformada com o vetor pLDV 702	Tavares et al. 2014
LDV 704	Linhagem que codifica a invasina de *Y. pseudotuberculosis* transformada com vetor pLDV 702.	Tavares et al. 2014

Tabela 1. Linhagens bacterianas *S. mutans* e *B. subtilis*.

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

Para a obtenção do fragmento $P1_{39-512}$ presente na linhagem LDV701 realizamos os ensaios de acordo com descrito por TAVARES et al., (2010). A linhagem LDV701 foi cultivada em meio Luria-Bertani (LB) contendo antibiótico cloranfenicol (30 µg/mL) e mantida sob agitação de 200 rpm a 37 °C por 16 horas. A cultura foi referida como pré-inóculo e cultivada na proporção de 1/100 diluída em 1 litro de meio LB e incubada a 37 °C sob agitação de 200 rpm até a densidade ótica (DO_{600}) correspondente a 0,6-08. Logo após, a expressão da proteína foi induzida pela adição do indutor IPTG (Isopropil β-D-tiogalacyosídeo) na concentração final de 1 mM. Posteriormente, a cultura foi mantida sob as mesmas condições descritas acima por até 4 horas. Ao fim da indução, a cultura foi centrifugada a 10.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a massa bacteriana obtida foi suspensa em 100 ml de tampão A (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5). Em seguida, foi adicionado lisozima (50 µg/ml) e o material mantido em gelo por 1 hora. Após esse período, foi acrescentado uma solução inibidora de protease contendo sulfato de dodecil de sódio (SDS) 0.01% acrescida de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.01 M. Posteriormente, as células

foram submetidas ao processo de lise mecânica sob alta pressão (600 psi em 15 minutos) em homogeneizador (APLAB-10). O material lisado foi clarificado por centrifugação a 10.000 rpm por 1 hora a 4 °C. A fração solúvel (sobrenadante) e a insolúvel (precipitado) foram separadas.

A fração solúvel contendo 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 ocorreu em aparelho AKTA – FPLC (Pharmacia) automatizado conforme instruções do fabricante. Anteriormente a realização do procedimento de purificação, a coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna (vc) de tampão A com fluxo correspondente de 1ml/min. A amostra foi aplicada na coluna em fluxo de 1ml/mine, posteriormente, a coluna foi lavada com 10 vc de tampão A, e seguiu-se o procedimento de eluição com diferentes concentrações de imidazol (200 mM, 500 mM e 1 M) em tampão B (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 M de Imidazol pH 7,5). A coluna foi regenerada com 5vc de tampão B e lavada com mais 5 vc de tampão A, 5 vc de água ultrapura e 5 vc com solução contendo 20% de etanol. As amostras eluidas correspondentes aos picos da proteína purificada foram submetidas ao processo de dialise para a retirada do imidazol em tampão (A). Após a diálise, as frações correspondentes ao pico da proteína de interesse foram reunidas e quantificadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% utilizando curva padrão de (BSA) (Pierce™) proteína do soro bovino. A proteína purificada foi confirmada por ensaio de *Western Blot* seguido por imunodetecção utilizando anticorpos específicos para cauda de histidina (anti-*HisTag).*

3.3 Expressão e Purificação da proteína LTK63

Para a produção da proteína LTK63, utilizamos a linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) que contém o vetor plasmidial modificado geneticamente para expressar a proteína recombinante LTK63, a qual previamente foi construida e comumente é utilizada como adjuvante vacinal em nosso laboratorio (RODRIGUES et al., 2011). A expressão da proteína iniciou-se previamente com o pré-inóculo da linhagem recombinante em 50 mL de caldo *Terrific Broth* (TB) contendo de 200 µg/mL de ampicilina em agitação a 230 rpm em 37 ºC por no máximo 18 horas. Após, a cultura crescida, referente ao pré-inóculo foi diluída 1:100 em 4 litros de meio TB e incubados sob agitação a 230 rpm a 37 ºC por um período de 22 horas até obter uma absorbância a

600nm de 0,5-0,6. Após ess período foi adicionado o indutor isopropil β-D-1 tiogalactopiranosideo (IPTG-*isopropyl B-D-1 thiogalactopyranaride*) em concentração final de 0,75 mM, e mantida nas mesmas condições de crescimento por um periodo de 18 horas. A cultura foi centrifugada por 10.000 rpm a 4 ºC por 30 minutos. O precipitado de células foi ressuspenso em 500 mL de tampão TEAN sem sal (Tris-HCL 0,5 M, EDTA 0,01 M, NaN_3 0,03 M, pH 7,4), e posteriormente submetido ao processo de lise em homogenizador de alta pressão (600 psi) aparelho (APLAB 10-Arte peças) por 2 minutos. O lisado foi centrifugado por 1 hora a 10.00 x g a 4 ºC, e por fim, o sobrenadante foi filtrado em em membrana 0,22 µm (Millipore).

Para o processo de purificação da proteína LTK63, utilizou-se a cromatografia de afinidade em resina de Galactose-gel (Pirece, Immobilized D-galactose Gel) empacotado em coluna XK 16/20 Amersham Biosciences (1,6 cm Ø e 20 cm de altura). Todo o processo de purificação ocorreu em método automatizado utilizando o aparelho AKTA-FPLC (Pharmacia). Primeiramente a coluna foi equilibrada em 5 volume de coluna (vc) em tampão TEAN contendo sal (Tris-HCL 0,5 M, EDTA 0,01 M, NaN_3 0,03 M, NaCl 2,0 M, pH 7,4). A amostra clarificada (500 mL) foi aplicada a coluna em um fluxo de 0,4 mL/minuto. Posteriormente passou-se por um processo de lavagem em tampão TEAN com sal, contendo 0,3 M de D-galactose. Em seguida, a coluna foi regenerada com 5 vc da solução (uréia 6 M, 5 vc de àgua ultrapura e 5 vc de àgua contendo 20% de etanol). Para retirada do eluente D-galactose, a amostra referente ao pico gerado, foi dialisada e concentrada em filtros Amicon Ultra-15 10.00 MWCO (Millipore) utilizando o tampão TEAN com sal. No final do experimento, as amostras coletadas foram avaliadas em gel de poliacrilamida de 17,5% para análise do grau depureza. A quantificação foi realizada por medida de absorbância em espectrofotômetro (Gene Quant spectrophptomer GE Amershan Biosciences), conforme descrita em Edelhoch (1967) e armazenada a -20 ºC.

3.4 Produção dos esporos recombinantes de *B. subtilis.*

Para obtenção dos esporos de *B. subtilis* (1012, LDV702 e LDV704), foi utilizado o protocolo para cultivo e purificação desenvolvido por (FOERSTER; FOSTER, 1966) e modificado por TAVARES et al., 2013. Inicialmente, as linhagens vacinais foram crescidas em meio LB por 16 horas. Em seguida, foram inoculadas em

meio líquido Foerster (F) contendo cloranfenicol (30 µg) para (LDV702) e uma mistura de cloranfenicol (30 µg) e espectinomicina (100 µg) para (LDV704), em sequência, essas culturas foram incubadas sob agitação constante a 37 °C por um período de 7 a 10 dias. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos e, em seguida, foram submetidas a três lavagens com água destilada. A quantificação dos esporos foi feita por meio da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) em meio LB contendo os antibióticos antes e após tratamento térmico de 60 minutos a 65 °C e, posteriormente, esses foram confirmados por contagem em câmera de Petroff-Hausse (esporos/mL). No final de todo processo, os esporos foram distribuídos em alíquotas de 1 ml em tubos tipo eppendorfs, liofilizados em aparelho LABCONCO Freezone[2.5] e armazenados a -20 °C até a utilização.

3.5 Protocolo vacinal e processamento das amostras.

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com idade entre 6 a 8 semanas de idade, foram distribuídos aleatoriamente em diferentes grupos (n=5/grupo) e, em seguida, submetidas ao regime vacinal do tipo prime/boost heterólogo com administração de três doses em intervalo de 15 dias entre as doses utilizando a via sublingual. Inicialmente os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg) e xilazina (80 mg/kg) administradas de acordo com o peso do animal. Na primeira dose os animais foram primados com 1 x 10^7 de esporos de *B. subtilis* 1012, LDV702, LDV704 ou PBS 1 x. Os esporos de cada linhagem, previamente liofilizados, foram ressuspensos em PBS 1 x e submetidos à diluição seriada até atingir uma concentração de 10^7 de esporos, em cada animal, utilizando uma micropipeta foi administrado 10 µL de PBS ou da solução (10^7 esporos dissolvidos em PBS). As duas doses de reforço foram administradas com 5 µg da proteína $P1_{39-512}$ recombinante purificada, sozinha ou associada com 5 µg do adjuvante LTK63. Como controle negativo, usamos animais imunizados apenas com PBS 1 x nas três doses.

Duas semanas após cada dose foi realizada a coleta de sangue dos animais por meio da punção do plexo submandibular. As amostras de sangue foram mantidas em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente e incubados por mais 30 minutos a 4° C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em 5.000 rpm a 4 °C por 30 minutos e, por fim, foi feita separação do soro e as amostras armazenadas a -20 até a realização das análises. Após o período completo do regime vacinal, os camundongos foram

eutanasiados, os baços foram coletados cirurgicamente, processados, e submetidos a análises por citometria de fluxo.

3.6 Análise da resposta humoral induzida após ensaio de imunização.

Os títulos de anticorpos séricos específicos para proteína $P1_{39-512}$ foram determinados por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando microplacas de poliestireno de 96 poços Costar (Corning). Essas foram sensibilizadas com a proteína recombinante $P1_{39-512}$, em PBS 1 x (200 ng/poço), por 16 horas a 4 ºC. No dia seguinte, as placas foram bloqueadas com (200 µl/ poço) com solução contendo 5% de leite diluído em PBS 1 x acrescido de 0,05% de Tween-20 (PBST, por 2 horas a 37 ºC. Após a realização de três lavagens com PBS- Tween 20 (0,05%) , amostras dos soros de cada animal obtidas após as três doses de imunizações foram diluídas (1:25) em solução (5% de leite) adicionados aos poços e submetidas à diluição seriada (fator de diluição 1:2). Em sequência, as placas foram incubadas por 1,5 hora em temperatura ambiente. Logo após esse período, foi realizado um novo ciclo de lavagens (3 x) e adicionado o anticorpo de detecção anti-IgG ou anti-IgG1 anti-IgG2a conjugados à peroxidase (Sigma) na diluição 1:500 para detecção de IgG total, 1:3000 para subclasse IgG1 e 1:400 subclasse IgG2a. Ao final do último ciclo de lavagens (3 x), as placas foram reveladas com uma solução de tampão citrato-fosfato 33 mM (pH 5) contendo (10 mg de OPD O-phenylenediamine) e de H_2O_2 por 15 minutos. Após esse período, a reação foi interrompida com a adição de 50 µl de H_2SO_4 1M e os níveis de anticorpos foram determinados por absorbância a 492 nm utilizando uma leitora de placa (LabSystem). Para determinar a concentração de anticorpos antígeno-específicos, utilizamos uma curva padrão de anticorpos IgG, IgG1, IgG2a (Sigma) estabelecidas. Para o teste de reconhecimento de epítopos conformacionais e lineares da proteína $P1_{39-512}$, foi utilizado a proteína íntegra e/ou desnaturada por calor (aquecida a 100 ºC e, em seguida, resfriada a 0 ºC) e utilizadas como antígenos para a sensibilização das placas. Todos os passos seguintes ocorreram conforme descrito no parágrafo acima.

Os soros obtidos após a terceira dose foram testados quanto à reatividade com a proteína nativa presente na superfície das diferentes linhagens de *S. mutans* (NG8, UA159 (sorotipo c), B14 (sorotipo e), OMZ175 (sorotipo f) gentilmente fornecida pela professora Drª. Maria Regina Lorenzetti Simionato. O ensaio de ELISA seguiu conforme descrito em TAVARES e colaboradores (2010). Inicialmente, foi feito o

cultivo da bactéria NG8 em meio Todd-Hewitt contendo 0,3% de extrato de levedura (THY). Em seguida, a cultura crescida foi centrifugada por 5 minutos a 7.000 rpm a 4 °C, submetida a duas lavagens com PBS 1 x, e o precipitado foi resuspenso com a mesma solução, com ($D.O_{600nm}$) ajustada para 1. Logo após, amostras das culturas foram distribuídas em microplacas de 96 poços Costar (Corning) e incubadas a 37 °C, com 5% de CO_2 por 16 horas. Após este período, os passos seguintes até a revelação seguiu de acordo com os procedimentos descritos no item anterior.

3.7 Ensaio de avidez dos anticorpos específicos para a proteína $P1_{39-512}$

Para a realização deste ensaio, as amostras de soros combinadas (*pool*) dos animais imunizados de cada grupo foram avaliados inicialmente para titulação de IgG total anti-$P1_{39-512}$, por meio de ensaio de ELISA e normalizados para (DO_{600nm}) de 1,0. Os passos seguintes ocorreram como o descrito no item 3.6 acrescentando etapa de dissociação dos anticorpos anti-$P1_{39-512}$ incubados em diferentes concentrações de tiocianato de amônio dissolvido em PBS (0,0 M, O, 1,25 M, 0,15M, 0,2 M, 0,3 M, 0,5 M, 1 M, 2 M, 4 M, ou 8 M) por um período de 15 minutos em temperatura ambiente. A percentagem de ligação anticorpo-antígeno correspondente à cada concentração de tiocianato de amônio foi estabelecida da seguinte forma: D.O. (490 nm) com a presença de tiocianato de amônio x 100/D.O. (490 nm) com ausência de tiocianato de amônio. A concentração de tiocianato necessária para dissociar 50% da ligação do anticorpo ao antígeno foi determinada por cálculo empregando o método de regressão linear.

3.8 Análise da resposta celular induzida após a vacinação.

Duas semanas após a última dose do regime vacinal, os animais imunizados foram eutanasiados os baços removidos e macerados em 3 mL de RPMI 1640 (Vitrocell/ Embriolife) 1%. Posteriormente as células foram centrifugadas a 1.500 rpm e lavadas com a mesma solução de RPMI 1%. Para a lise dos eritrócitos, as amostras foram tratadas com tampão contendo amônio e potássio (Tampão ACK) 1 mL/ baço, e lavadas mais uma vez com RPMI 1%. Para determinação dos níveis de secreção de citocinas, utilizamos o sobrenadante da cultura de células dos grupos imunizados. A realização deste ensaio ocorreu de acordo com as instruções do kit comercial BD™CytometricBeadArray Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (CBA). Esplenócitos

em concentração aproximadamente de 1 x 10^6 células/poço foram cultivadas por um período de 72 horas a 37 °C em placas de fundo plano em presença de 500 µl de meio RPMI completo, na presença ou ausência do antígeno $P1_{39-512}$ em 10 mg/ml. Posteriormente a essa incubação, o processamento do sobrenadante foi realizado conforme as instruções descritas no kit. A detecção foi feita de acordo coma emissão de fluorescência utilizando a citometria de fluxo LSRFortessa™ (BD Bioscience) e os níveis analisados de acordo com BD CBA Software.

Para análise de ativação de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ as células obtidas do sobrenadante das amostras foram contadas em câmera de Newbauer (10^7 de células/mL) e incubadas por 16 horas, a 37 ºC em atmosfera de 5% de CO2 na presença de brefeldina-A e 10 mg/mL e da proteína $P1_{39-512.}$ Após o período de incubação com tampão de Facs (tampão MACS (PBS 1 x contendo 2 mM de EDTA e 0,5% de BSA) , células foram marcadas com anticorpos conjugados anti-CD8 (FITC) e anti-CD4 Cy5(BD BioSciences). Posteriormente, as células foram lavadas, fixadas com tampão Cytofix e permeabilizadas com tampão Cytoperm de acordo com as especificações do fabricante (kit BD Cytofix/Cytoperm™) e marcados intracelularmente com anticorpos conjugados anti-IL4 conjugada à (PE), IFNγ conjugada ao Alexia 700 (BD BioSciences). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACS Fortessa) os resultados obtidos foram avaliados por meio do software FlowJo.

3.9 Análises estatísticas

Para os testes estatísticos, utilizamos o programa GRAPHAD PRISM 6. As diferenças estatísticas significantes das análises das respostas imunológicas foram determinados entre os grupos vacinais utilizando-se o teste *one-way* (ANOVA) para análise de variância com subsequente teste de comparação múltipla de Bonferroni. A significância foi definida por asterísticos: *, P< 0,05; **, P< 0,01; ***, P< 0,001.

4 RESULTADOS

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

A fração solúvel do extrato bacteriano da linhagem LDV701 de *B. subtilis*, manipulada geneticamente para expressar a proteína $P1_{39-512}$, foi submetida ao processo de purificação por meio de cromatografia de afinidade ao níquel utilizando o aparelho Akta (FPLC). A eluição da proteína foi realizada mediante a aplicação de diferentes concentrações de imidazol (100 mM, 500 mM e 1M). A proteína recombinante foi obtida em pico único na concentração de 500 mM de imidazol (**Figura 2 A**). Após eluição, as frações correspondente ao pico (6, 7, 8, 9 e 10) foram submetidas a análises eletroforéticas em gel de poliacrilamida, permitindo identificar a proteína de interesse com elevado grau de pureza e com massa molecular esperada de 50 kDa. A confirmação da proteína alvo foi realizada por imunodetecção em ensaio de *Western Blot* que possibilitou a identificação mediante reatividade com anticorpos específicos contra a cauda de histidina (anti-*HisTag*) (**Figura 2 B**).

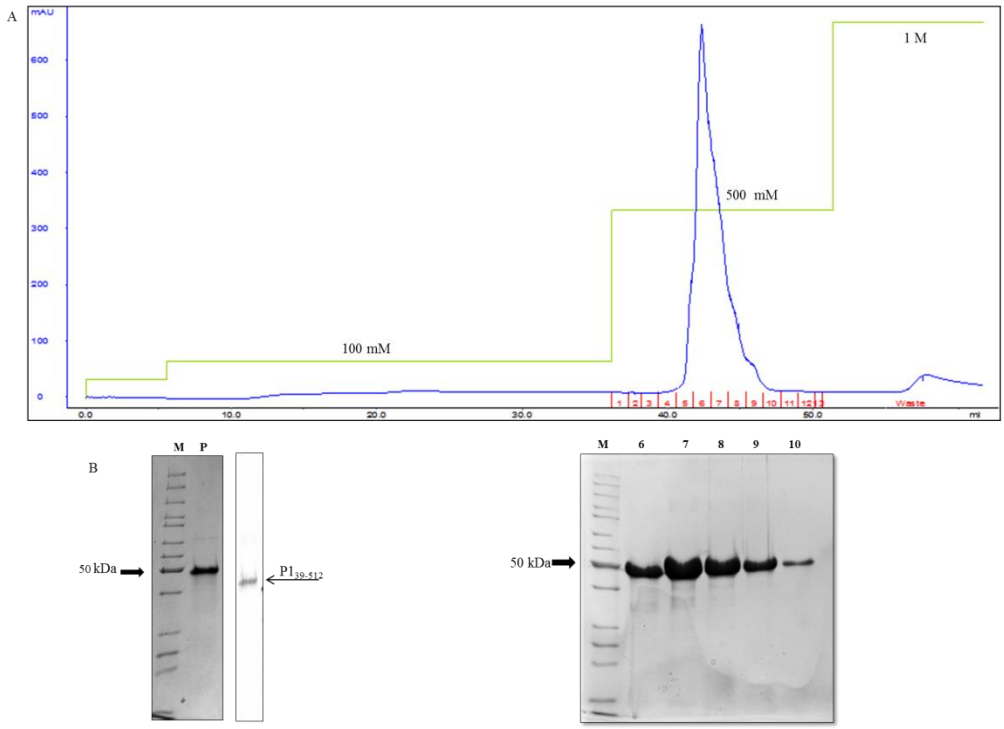


Figura 2 - Purificação da proteína $P1_{39-512}$ por cromatografia de afinidade ao níquel. A fração solúvel da linhagem LDV701 de *B. subtilis*, induzida com 1m M de IPTG, foi submetida à cromatografia de afinidade ao níquel com auxílio de aparelho Akta- FPLC. (A) Cromatograma da eluição da proteína com crescentes concentrações de imidazol (100 mM, 500 mM e 1M). As alíquotas (6, 7, 8, 9 e 10) correspondentes ao pico da eluição foram submetidas à análise eletroforética em gel de poliacrilamida a 12,5% (5 µL/poço). (B) Amostras correspondentes ao *pool* da proteína purificada foram avaliadas em gel de poliacrilamida e imunodetectada após ensaio de *Western Blot.* Descrição: M (marcador de peso molecular); P (proteína purificada).

4.2 Obtenção dos esporos de *B. subtilis*

Células de *B. subtilis* das linhagens 1012, LDV702 e LDV704 foram cultivadas em meio Foerster durante 7- 10 dias e purificados por meio de lavagens sucessivas com água destilada. A determinação da concentração dos esporos foi estabelecida por contagem de (UFC/mL), antes e após o tratamento térmico a 65 °C por 1 hora, e também por meio da câmera de Neubauer. Na **figura 3**, demonstra-se os esporos da linhagem 1012 (selvagem) visualizados por microscopia de contraste de fase. Observamos apenas a presença de esporos após processo de esporulação e purificação.

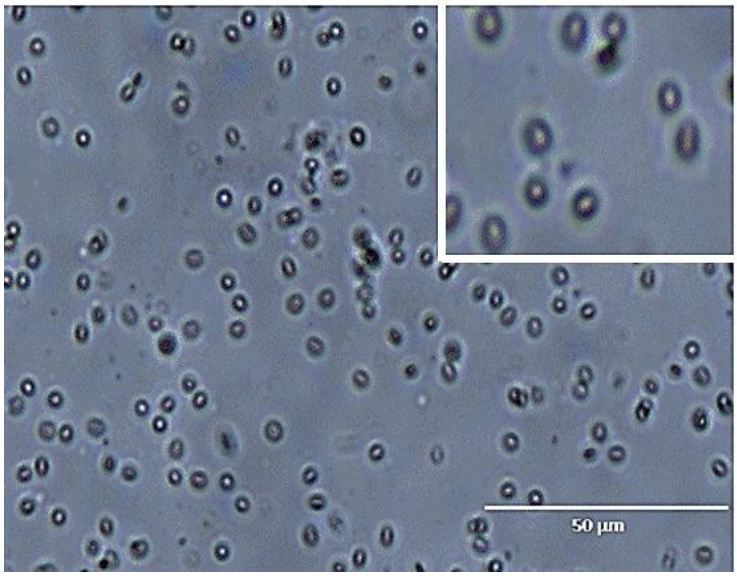


Figure 3 - Visualização dos esporos de *B. subtilis* 1012 por microscopia de contraste de fase após o processo de esporulação e purificação. As amostras foram submetidas ao processo de esporulação em meio Foerster modificado. A purificação foi realizada por lavagens consecutivas com água destilada. Imagem com aumento final de 600 x.

4.3 Purificação da proteína recombinante LTK63

Para a purificação da proteína LTK63 utilizamos o método de cromatografia de afinidade empregando uma coluna com uma resina ligada à D-galactose. Como podemos observar no cromatograma representativo do processo de eluição, a proteína recombinante foi eluída em um pico único de 500 mAU (**Figura 4 A**). Uma vez eluidas, as amostras referentes ao pico foram reunidas e corridas em gel de poliacrilamida a 17,5% para análise do grau de pureza (**Figura 4 B**). Nas alíquotas submetidas ao

tratamento por fervura (100 ºC) foi possível identificar uma banda de 27 kDa, correspondente ao tamanho da subunidade A e outra referente à subunidade B com 11,6 kDa. As alíquotas não fervidas apresentaram uma banda da subunidade A e outra de 55 kDa correspondente ao pentâmero da subunidade B. Para a confirmação da natureza da proteína utilizamos a imunodetecção após *Western Blot.* Após a purificação, obtivemos um rendimento total de 10 mg por litro de cultura.

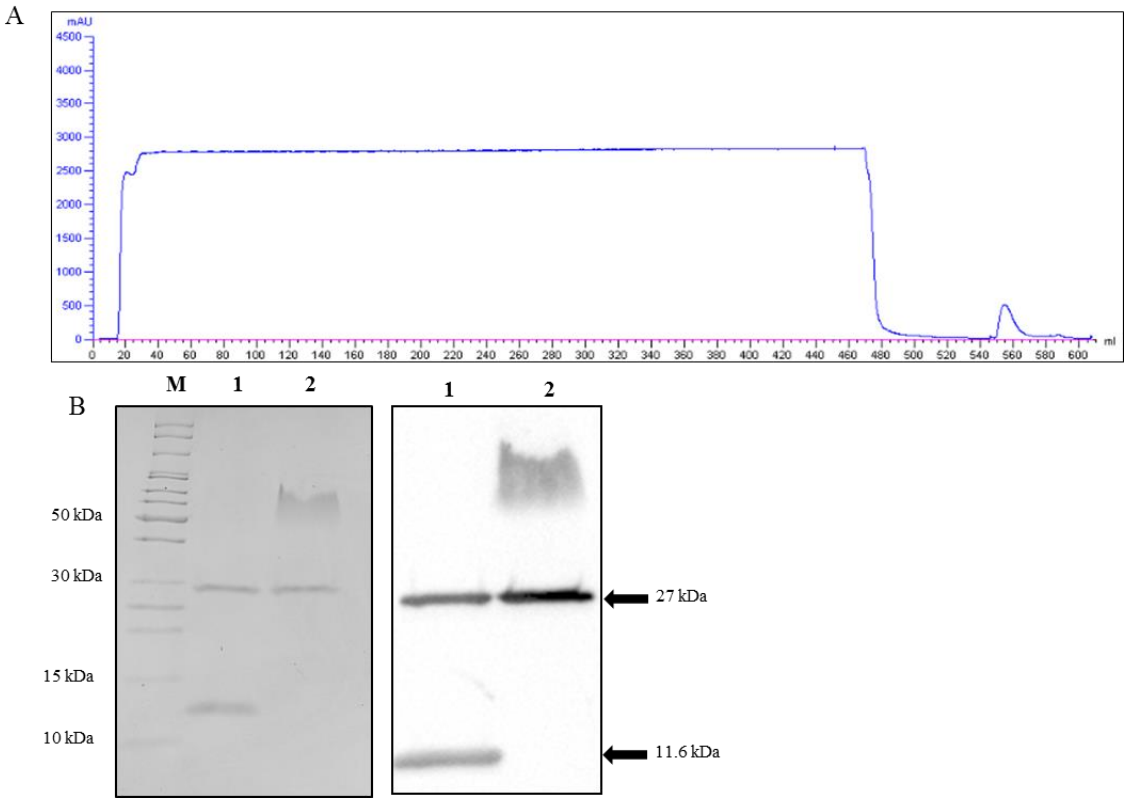


Figura 4 - Purificação da proteína recombinante LTK63. A fração solúvel do extrato bacteriano da linhagem de *E. coli* BL21 (DE3), contendo a proteína LTK63, foi purificada por método automatizado Akta-FPLC em coluna com resina de D-galactose. Cromatograma representativo do processo de purificação da proteína LTK63. (A) Gel de poliacrilamidaa17% utilizado como método de avaliação do grau de pureza das amostras. (B) Imunodetecção da proteína após *Western Blot.* Descrição: M (marcador de peso molecular); 1 - proteína purificada fervida a 100 ºC (subunidade A com banda correspondente a 27 kDa e subunidade B com 11,5 kDa); 2 - proteína não fervida (pentâmero de subunidade B com banda de 55 kDa).

4.4 Regime de imunização

Para uma melhor organização e entendimento do trabalho resolvemos dividir os resultados deste trabalho em dois blocos. No primeiro bloco foram descritos os resultados obtidos após os ensaios de imunização utilizando a estratégia dose-reforço heterólogo, administrando os esporos na primeira dose e dois reforços com a proteína purificada, ambos pela via sublingual. No segundo bloco descrevemos os resultados de outros ensaios utilizando o mesmo esquema de imunização, entretanto, testando o consórcio da proteína purificada combinada ao adjuvante LTK63 nas doses de reforço.

4.5 Bloco1: Avaliação da imunogenicidade da proteína recombinante $P1_{39-512}$ após o regime vacinal dose-reforço heterólogo administrado pela via sublingual.

Após a obtenção dos esporos de *B. subtilis* e da proteína recombinante $P1_{39-512}$, iniciamos as etapas de imunização utilizando camundongos fêmeas da linhagem BALB/c e a via sublingual para administração das doses. O regime vacinal consistiu com três doses na forma de dose-reforço heterólogo com intervalo de 15 dias entre as mesmas. Na primeira dose os animais previamente anestesiados receberam 10^7esporos de *B. subtilis* projetados para expressar ou não a proteína $P1_{39-512}$ em fase de germinação (LDV702 ou LDV704), ou a linhagem selvagem (1012). No segundo e terceiro reforços, os camundongos receberam 5 µg/dose da proteína $P1_{39-512}$. Como grupo controle experimental, tratamos os camundongos com PBS nas três doses, conforme ilustrado na **Figura 5**. Duas semanas após cada dose, amostras de soros dos animais foram coletadas individualmente e os títulos de anticorpos induzidos pelas formulações vacinais foram mensurados por ELISA.

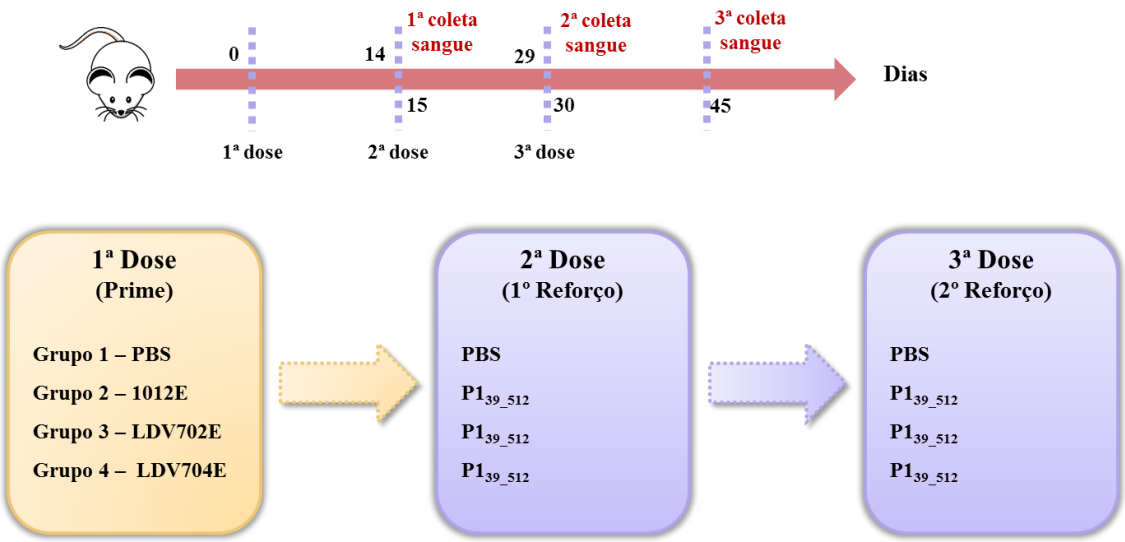


Figura 5 - Regime vacinal por via de mucosa testado no bloco 1. Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, distribuídos em quatro grupos (n= 5 por grupo), foram imunizados pela via sublingual em regime vacinal de dose/reforço heterólogo com três doses. Na primeira dose, os grupos vacinais foram imunizados com esporos (E) de *B. subtilis* da linhagem não recombinante (1012 E) e das linhagens recombinantes (LDV701 E e LDV704 E). Na segunda e terceira doses esses animais receberam reforços com a proteína $P1_{39\text{-}512}$ purificada. Duas semanas após cada dose foram colhidas amostras de sangue dos animais imunizados e, com 3 semanas após a ultima dose, amostras de baços e linfonodos foram coletadas.

Como podemos observar na **figura 6 A**, os diferentes regimes vacinais empregados induziram títulos de anticorpos IgG específicos frente a proteína $P1_{39\text{-}512}$. No grupo que recebeu esporos da linhagem selvagem (1012) seguido de duas doses reforço da proteína $P1_{39\text{-}512}$ foram detectados títulos de anticorpos somente após a última dose. Já os soros dos animais imunizados com os esporos das linhagens recombinantes (LDV702 e LDV704), mais duas doses reforço da proteína $P1_{39\text{-}512}$, detectamos títulos de anticorpos específicos após cada uma das doses. Observamos também que o grupo que recebeu os esporos da linhagem LDV702 apresentou ligeiro aumento no título de anticorpos após a terceira dose.

Com objetivo de avaliar o perfil de resposta imunológica humoral induzido após a imunização com cada uma das formulações vacinais, analisamos os títulos de subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) presente nas amostras de soro dos animais imunizados (**Figura 6 B**). Observamos que todas as formulações testadas induziram anticorpos específicos da subclasse IgG1. Por outro lado, não detectamos anticorpos específicos da subclasse IgG2a. Esses resultados indicam a polarização da resposta imune humoral para um perfil do tipo Th2.

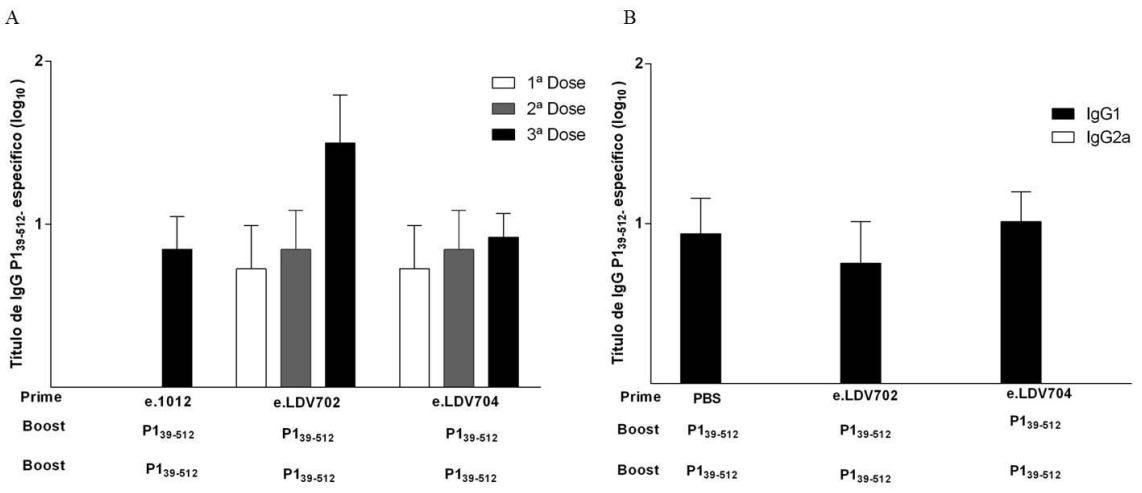


Figura 6 - Detecção de anticorpos IgG e subclasses (IgG1/IgG2a) $P1_{39-512}$ –específicos presentes no soro dos animais imunizados. (A) Curva dose-resposta de títulos de anticorpos IgG específicos para a proteína $P1_{39-512}$ detectados nos soros dos animais imunizados. (B) Análise de subclasses de IgG (IgG1/IgG2a) nos grupos vacinais após a administração da última dose vacinal prevista no regime de imunização. Os resultados referem-se a três experimentos independentes. Os valores encontrados estão expressos em título médio de anticorpos (Log10) ± S.E.M. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001. (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni´s).

4.5 Avaliação da reatividade dos soros de animais imunizados contra epítopos conformacionais e lineares presentes na proteína recombinante $P1_{39-512}$.

Após análise e caracterização da resposta humoral desencadeada após o regime vacinal, o próximo passo foi avaliar a capacidade dos anticorpos induzidos em reconhecer epítopos conformacionais ou lineares presentes na proteína $P1_{39-512}$. Para isso, os soros dos animais, obtidos após a administração da última dose vacinal foram testados quanto à reatividade frente à proteína recombinante $P1_{39-512}$ em sua forma intacta ou desnaturada (por ação do calor, 100 ºC), em ensaios de ELISA. Conforme representado na **figura 7**, observamos que todos os soros analisados reconheceram de forma semelhante à proteína recombinante $P1_{39-512,}$ tanto na forma intacta ou desnaturada, demonstrando assim, que os anticorpos específicos induzidos após a imunização com as diferentes formulações vacinais foram capazes de reconhecer principalmente epítopos lineares presentes na proteína recombinante.

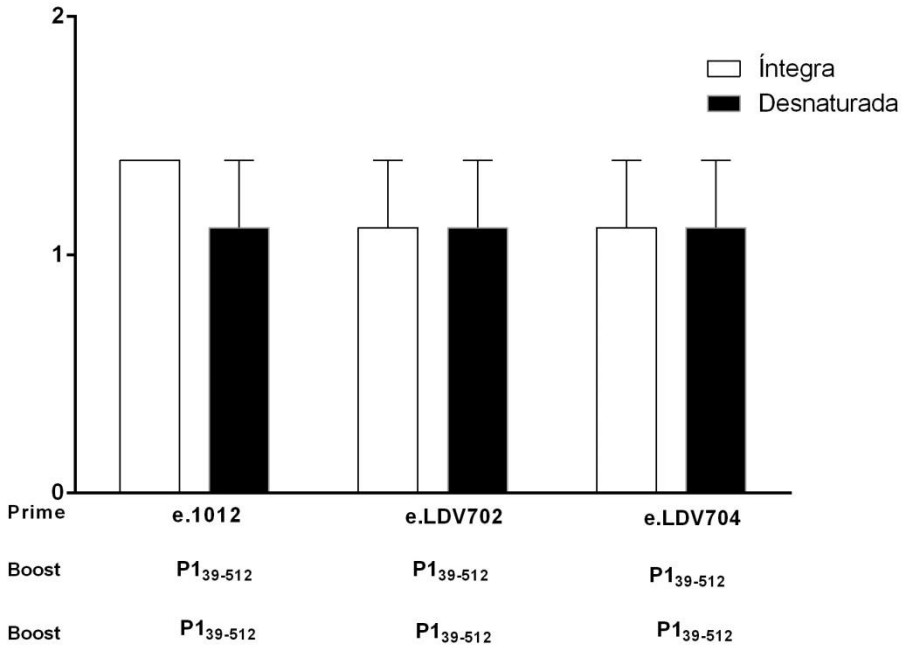


Figura 7 - Avaliação da capacidade dos anticorpos $P1_{39-512}$-específicos se ligarem a epítopos da proteína recombinante. Amostras de soro dos animais imunizados foram testadas em ELISA quanto à sua reatividade com a proteína recombinante $P1_{39-512}$ submetida ou não ao processo de desnaturação por aquecimento (100 ºC por 10 minutos seguido de choque térmico a 0 ºC). As amostras utilizadas correspondem a misturas de soros de cada animal por grupo (n=5/grupo) coletados após a terceira dose. Os resultados apresentados são representativos de dois ensaios independentes. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001. (Two-way ANOVA com pos-testBonferroni´**s).**

4.6 Determinação do perfil de citocinas produzidas nos animais imunizados

Como descrito acima, a análise do perfil de subclasses de IgG no soro dos animais imunizados indicou uma tendência para um perfil de resposta humoral do tipo Th2 em todos os grupos vacinais. A fim de confirmar o perfil da resposta imune induzida, realizamos ensaios celulares para avaliar a produção das citocinas INF-γ, IL-6, IL-10 e IL-17 *in vitro*. Para isso, os esplenócitos dos animais foram reestimulados com a proteína $P1_{39-512}$. Ao analisarmos os níveis das referidas citocinas foi possível detectar perfis diferentes entre os grupos imunizados com as diferentes formulações. No grupo dos animais imunizados com esporos da linhagem 1012 na primeira dose foram detectadas todas as citocinas testadas, com maiores níveis para IFN-γ (**Figura 8 A**). Em contrapartida, no grupo de animais que foram imunizados com esporos da linhagem LDV702, detectamos a IL-10 e níveis semelhantes das citocinas IL-6 e IFN-γ, indicativo de um perfil de resposta imune mista. Por outro lado, no grupo que recebeu a linhagem LDV704 não foi possível detectar nenhuma das citocinas dosadas no ensaio (**Figura 8).**

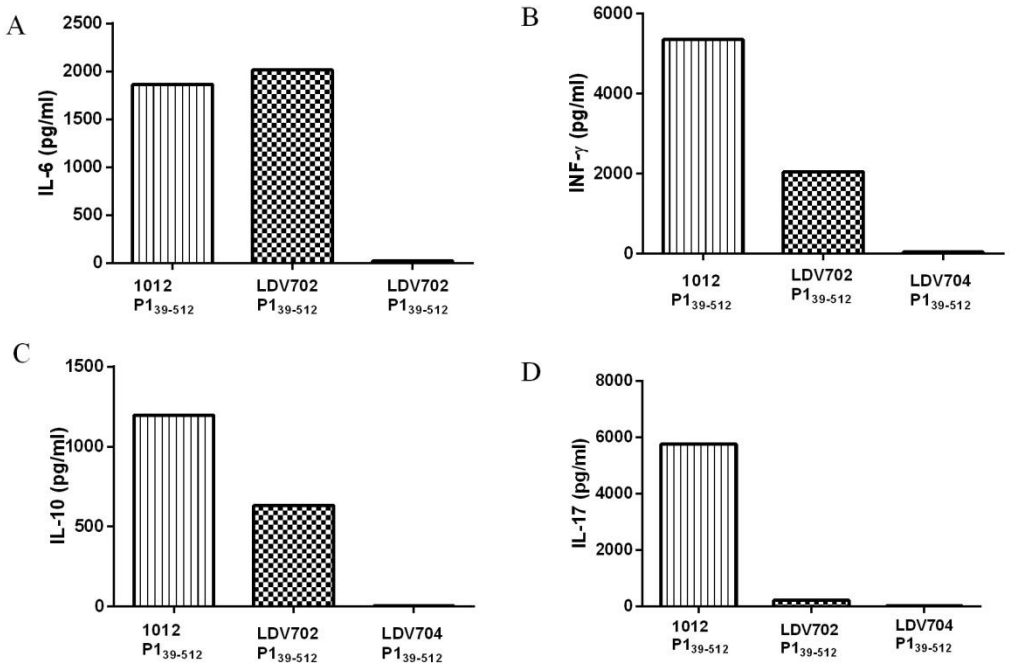


Figura 8 - Análise do perfil das citocinas IL-6, IFN-γ, IL-10 e IL-17 produzidas por esplenócitos dos camundongos imunizados e reestimulados *in vitro*. As células dos animais foram obtidas duas semanas após a última dose de reforço do regime vacinal. Os esplenócitos dos animais foram reestimulados com 5 µg da proteína $P1_{39-512}$durante 72 horas a 37 ºC.

4.7 Avaliação de respostas celulares induzidas pelos regimes vacinais

A fim de verificar se os diferentes regimes vacinais empregados ativariam respostas celulares mediadas por linfócitos T, realizamos análises de ativação de linfócitos $TCD4^+$ ou $TCD8^+$ produtores de IL-4 ou IFN-γ. Para isso, os esplenócitos proveniente dos animais imunizados com as diferentes formulações foram reestimulados com a proteína $P1_{39-512}$ e analisados por citometria de fluxo. Ao analisarmos os diferentes grupos, observamos que a porcentagem de células $TCD4^+$ **(Figura 9 A)** ou $TCD8^+$ **(Figura 9 B)** produtoras de IFN-γ foi semelhantemente, quando comparado com o controle. Além disso, também foi visto o mesmo padrão de resposta quando verificamos a porcentagem de células $TCD4^+$ produtoras de IL-4 **(Figura 9 C)**. Esses resultados permitem concluir que as formulações, nas condições testadas, não induzem ativação de linfócitos $TCD4^+$ ou $TCD8^+$ produtoras de IL-4 ou IFN-γ.

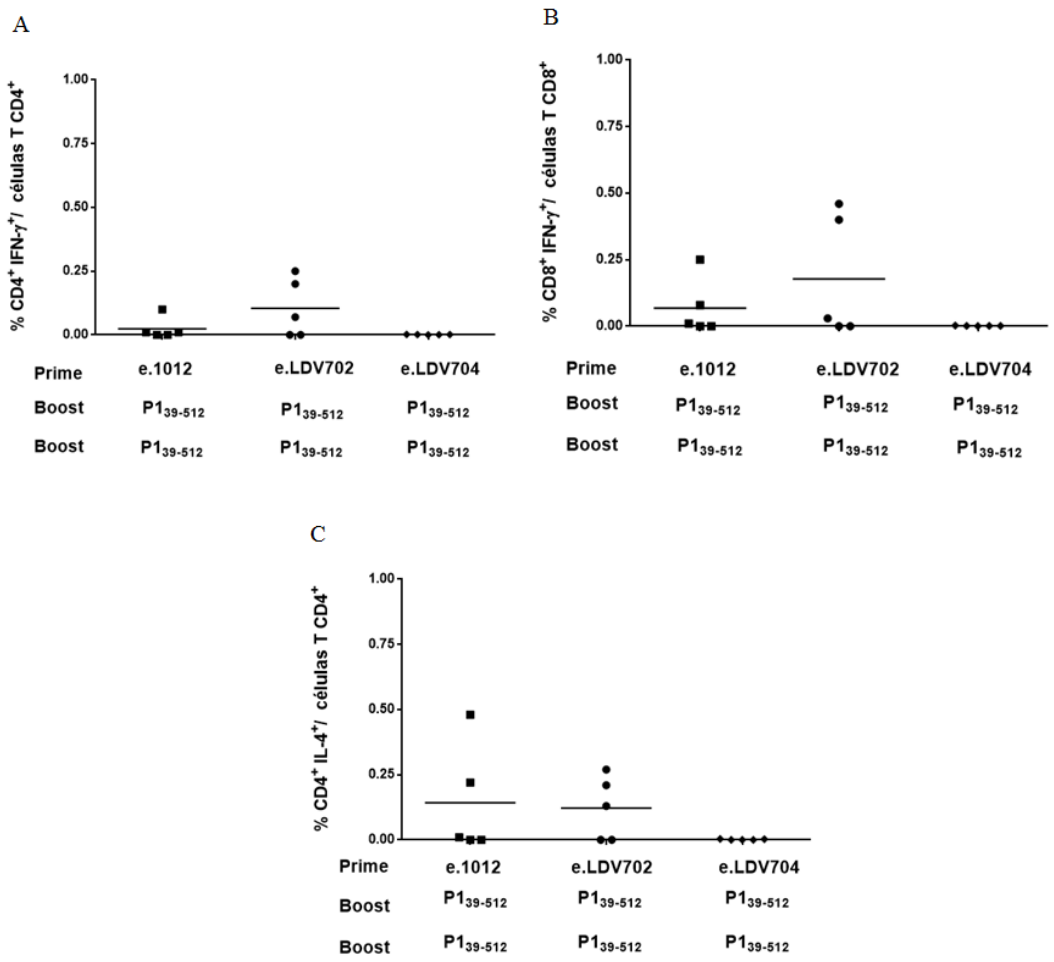


Figura 9 - Avaliação *in vitro* da ativação de linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ produtores de IL-4 ou IFN-γ específicos para $P1_{39-512}$. As amostras de baço foram coletadas três semanas após a última dose e analisadas por citometria de fluxo. Esplenócitos dos animais imunizados foram estimulados *in vitro* com 5 µg da proteína $P1_{39-512}$ por 16 horas para análise de ativação de células T. (A) Porcentagem de células T $CD4^+$ produtoras de IFN-γ. (B) Porcentagem de células T $CD8^+$ produtoras de IFN-γ. (C) Porcentagem de células T $CD4^+$ produtoras de IL-4.

4.8 Bloco 2: Avaliação da incorporação do adjuvante LTK63 ao regime de imunização dose-reforço heterólogo.

Diante da baixa imunogenicidade observada para as formulações aqui propostas, avaliamos a incorporação do adjuvante LTK63 às formulações descritas anteriormente, com objetivo de potencializar as resposta antígeno-específicas geradas. Para isso, na primeira dose vacinal os animais foram sensibilizados com esporos de *B. subtilis* e, na administração das doses de reforço, os camundongos receberam a proteína recombinante $P1_{39-512}$ coadministrada ou não com o adjuvante LTK63, como mostra a **figura 10**.

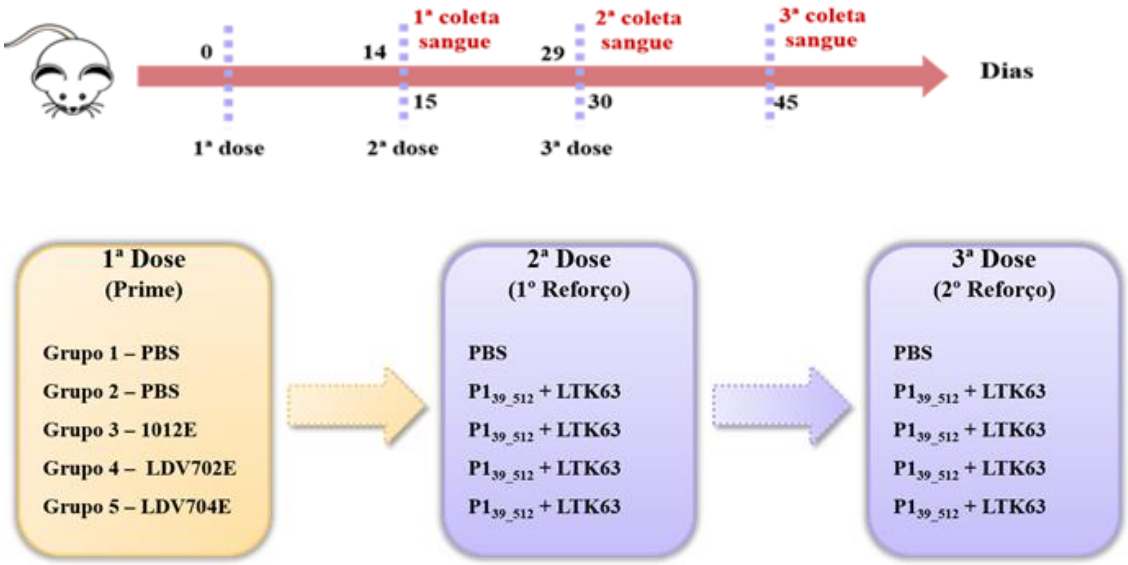


Figura 10 - Regime vacinal administrado por via sublingual do bloco 2. Camundongos BALB/c distribuídos em sete grupos (n= 5 por grupo) foram imunizados em um regime dose reforço heterólogo de três doses. Na primeira dose, os grupos receberam esporos (E) de *B. subtilis* (linhagem 1012 E, LDV701 E ou LDV704 E) ou tratados com PBS. Na segunda e terceira doses esses animais receberam o segundo e terceiro reforços com a proteína $P1_{39\text{-}512}$ combinada ao adjuvante LTK63. Duas semanas após cada dose, foram colhidas amostras de sangue dos animais imunizados e, 3 semanas após a última dose de imunização, amostras de baços e LNC foram coletadas.

Ao analisar os resultados, observamos que a imunização com a linhagem selvagem 1012 ou o tratamento com o PBS, seguido de duas doses reforço da proteína $P1_{39\text{-}512}$, induziu títulos anticorpos IgG específicos apenas após a terceira dose com a proteína recombinante. Já nos grupos imunizados com esporos das linhagens LDV702 e LDV704 e duas doses da proteína $P1_{39\text{-}512}$ detectamos títulos de anticorpos específicos após cada uma das doses, com aumento significativo após a última dose do reforço **(Figura 11 A)**.

A fim de compreender a modulação do perfil das respostas imunológicas induzidas pelas formulações vacinais, medimos os títulos de subclasses de IgG ao final do protocolo vacinal, conforme ilustrado na **figura 10**. Na **figura 11 B** é possível observar que em todas as amostras dos animais imunizados foram detectados títulos de ambas as subclasses IgG avaliadas, sendo esse resultando um indicativo de um perfil de resposta mista Th1/Th2.

Em uma comparação dos títulos de IgG induzidos após os dois regimes de imunização testados (Bloco 1 e Bloco 2), observa-se que o regime vacinal empregando o adjuvante LTK63 mostrou ser mais eficiente na ativação do sistema imune dos

animais imunizados, com aumento significativos nos títulos de anticorpos (pelo menos 100 x mais) após a terceira dose **(Figura 11 C).**

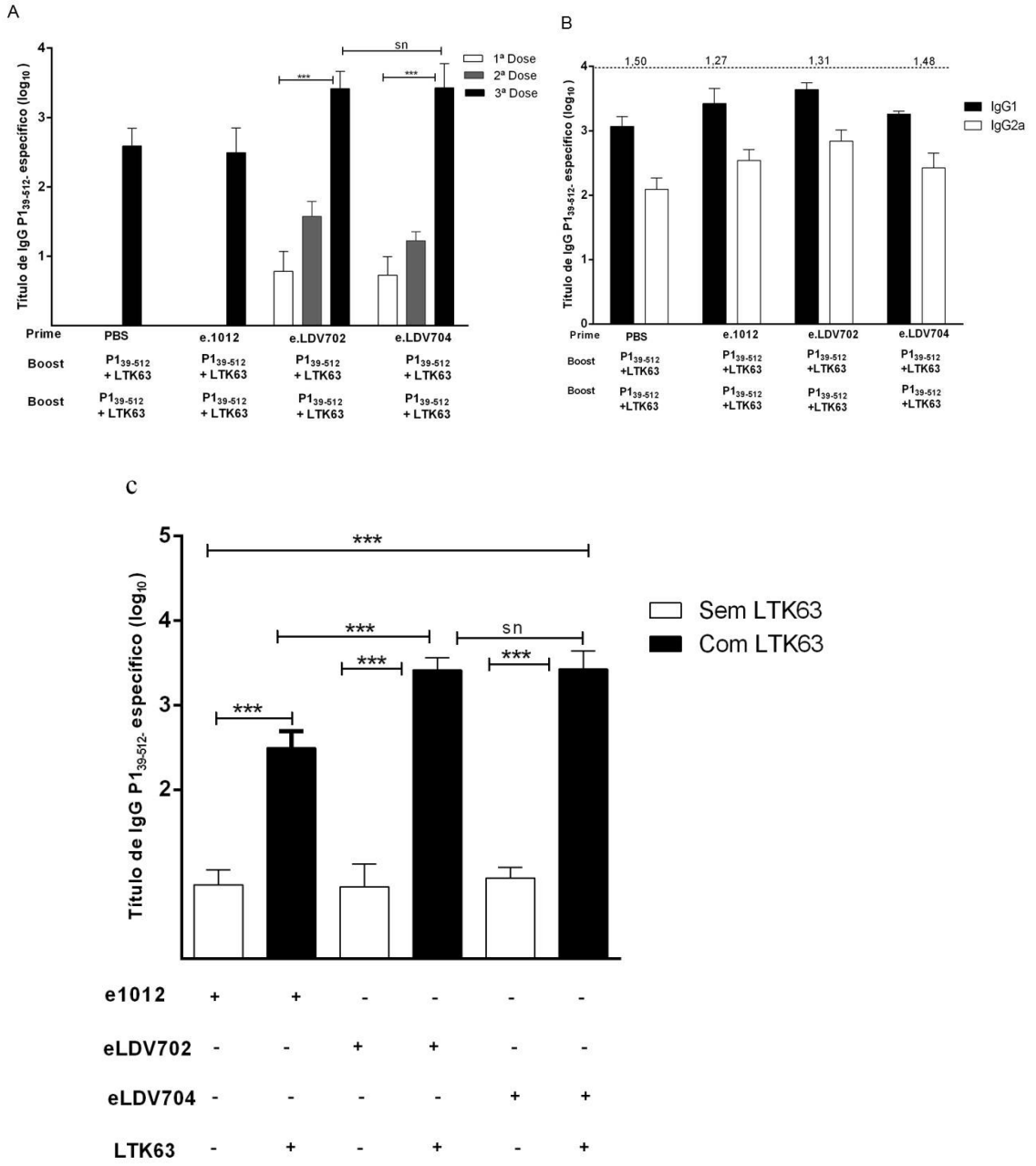


Figura 11 - Detecção de títulos de IgG e subclasses IgG1/IgG2a específicos para a proteína recombinante $P1_{39\text{-}512.}$ (A) Detecção dos títulos de IgG e subclasses IgG1/IgG2a determinados por ensaios de ELISA . (B) Análise de subclasses de IgG nos grupos vacinais após o regime de imunização. (C) Comparação dos títulos de anticorpos IgG dos soros individuais pós terceira dose entre os dois blocos de imunização (com ou sem a presença de LTK63 junto às formulações). Os dados obtidos com a razão IgG1/IgG2a foram avaliados e estão descritos na parte superior do gráfico. Os resultados referem-se a três ensaios de imunização independentes. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$. **(**Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni´s).

4.9 Reatividade dos soros anti-$P1_{39-512}$ contra epítopos conformacionais e lineares presentes na proteína recombinante $P1_{39-512}$.

Na etapa seguinte, fomos avaliar qualitativamente os soros gerados após estímulos pelas diferentes formulações vacinais. Deste modo, em ensaios de ELISA, testamos a reatividade dos anticorpos obtidos após a última dose (3ª dose) quanto ao reconhecimento de epítopos conformacionais ou lineares da proteína $P1_{39-512}$. Como podemos observar na **figura 12**, todos os soros gerados após o regime vacinal apresentaram eficiência no reconhecimento de epítopos lineares presentes na proteína. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, na reação do soro com a proteína desnaturada ou intacta.

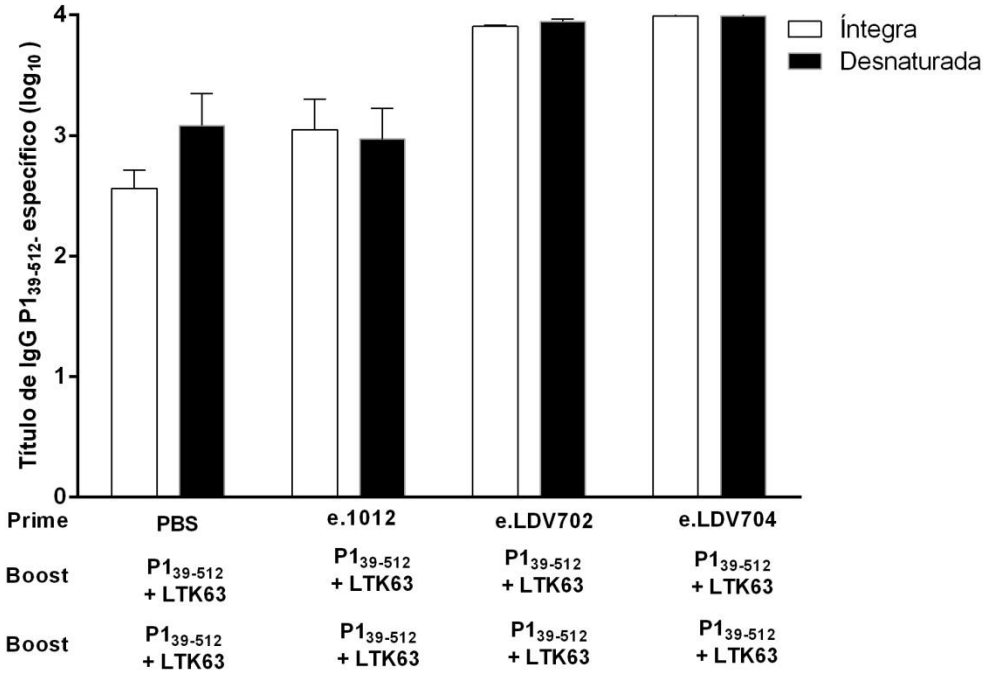


Figura 12 - Avaliação da capacidade dos anticorpos se ligarem em epítopos da $P1_{39-512}$-específicos. Anticorpos $P1_{39-512}$- específicos presentes no pool de soros colhidos após a terceira dose foram testados quanto à sua reatividade com a proteína recombinante $P1_{39-512}$ submetida ou não ao processo de desnaturação por aquecimento (100 ºC por 10 minutos e, em seguida, o choque térmico a 0 ºC). As amostras utilizadas correspondem a mistura de soros de cada animal por grupo (n=5/grupo), coletados após a terceira dose de imunização. Os resultados apresentados são representativos de dois ensaios independentes. *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001(Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni´s).

4.10 Avaliação da efetividade dos anticorpos gerados pelas formulações vacinais no reconhecimento da proteína P1 na superfície em diferentes linhagens de *S. mutans*

Após análise da reatividade dos anticorpos gerados contra a proteína $P1_{39-512}$, testamos a capacidade desses anticorpos em reconhecer o mesmo fragmento na proteína inteira (P1) nativa expressa na superfície de algumas linhagens de *S. mutans*. Como demonstrado na **figura 13**, todas as amostras de soro testadas reagiram com as bactérias testadas, especialmente com as linhagens UA159 e NG8.

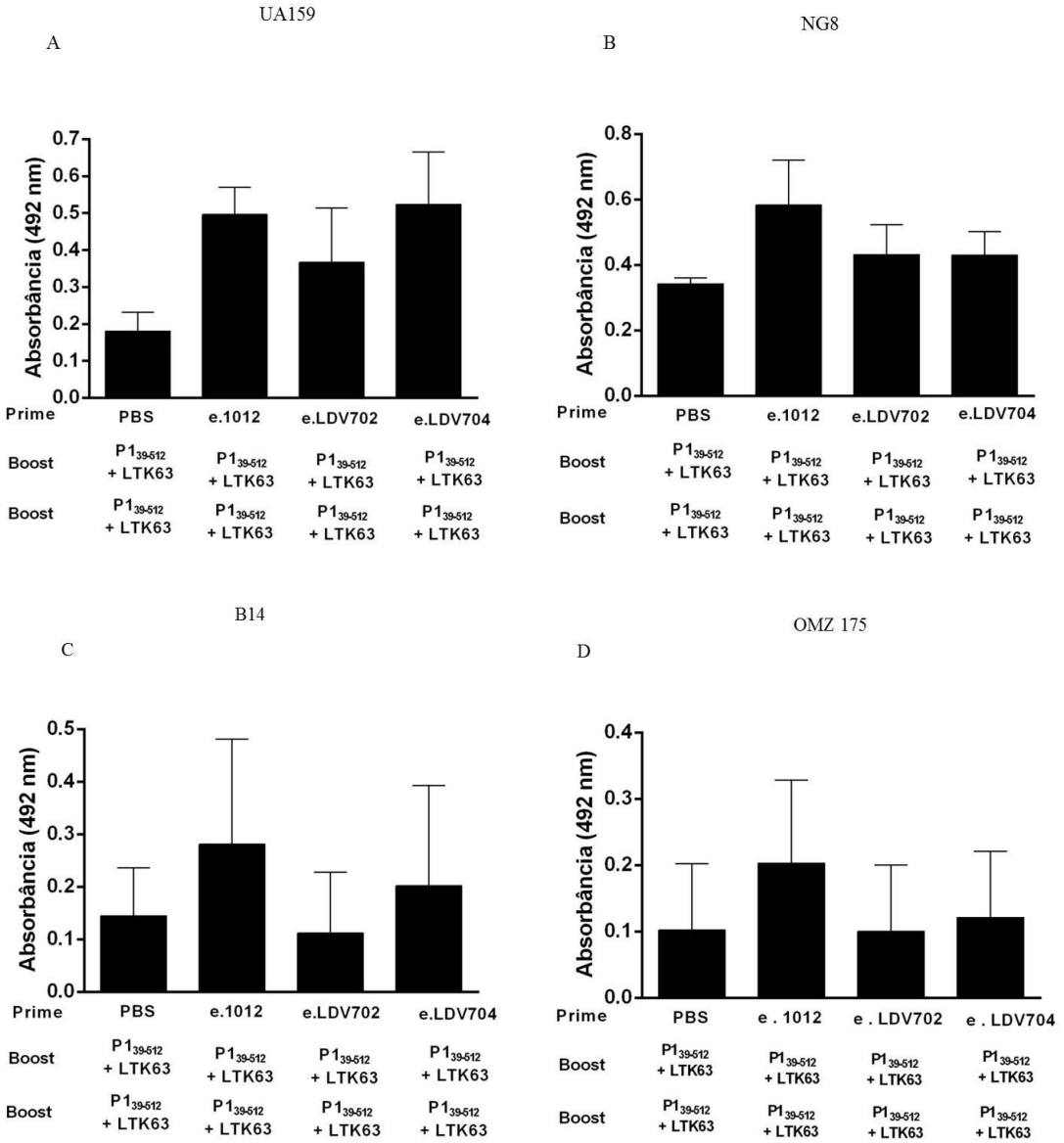


Figura 13 - Avaliação da reatividade dos anticorpos com a proteína P1 nativa presente na superfície de diferentes linhagens de *S. mutans.* Células de *S. mutans* das linhagens UA159, NG8, B14 e OMZ175, representadas, respectivamente, nas figuras A, B, C e D, foram testadas como antígeno de fase sólida em ensaios de ELISA. Os"pools"de soros de animais imunizados com as formulações vacinais foram utilizados para avaliar as respostas de IgG específico. Os resultados são representativos de um único experimento realizado em duplicata, os valores estão expressos em forma em absorbância +/- DP.

4.11 Determinação da avidez dos anticorpos gerados ao antígeno recombinante $P1_{39-512}$.

Outro teste empregado na avaliação qualitativa dos anticorpos gerados nas imunizações foi o ensaio de avidez ao antígeno. Esse teste tem como principio demonstrar a força de ligação dos anticorpos gerados ao antígeno. A avidez dos anticorpos foi avaliada tendo como base a dissociação da interação antígeno-anticorpo, pela adição do reagente tiocianato de amônio em diferentes concentrações, em ensaios de ELISA. Como podemos observar na **figura 14,** a quantidade de tiocianato necessária para dissociar 50% dos anticorpos ligado à proteína $P1_{93-512}$ foi semelhante em todas as amostras testadas.

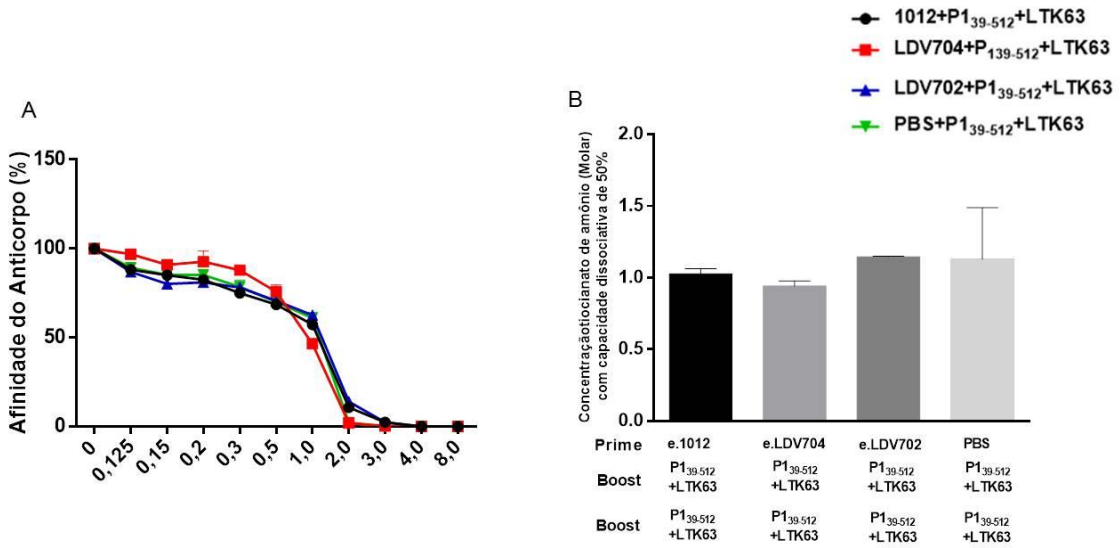


Figura 14 - Avaliação da avidez dos anticorpos gerados com a proteína $P1_{39-512}$. A afinidade entre os anticorpos e o antígeno foi determinada em ensaios de ELISA utilizando-se diferentes concentrações do agente dissociante tiocianato de amônio, tendo como antígeno de fase sólida a proteína recombinante $P1_{39-512}$. (A) Determinação da concentração de tiocianato de amônio necessária para dissociar metade dos anticorpos ligados ao antígeno $P1_{39-512}$. (B) Curva com diferentes concentrações de tiocianato e percentual de ligação correspondente. Amostras de soro (correspondentes às amostras coleadas após a 3ª dose) foram normalizados e utilizadas neste ensaio. Os dados referem-se a dois ensaios independentes *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$. (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni´s).

4.12 Avaliação de citocinas

Tendo como base a indução IgG1 e IgG2a nos animais imunizados, verificamos se o mesmo perfil de resposta imunológica seria observado após a medição da produção das citocinas IL-6 e IFN-γ em células colhidas dos animais imunizados. Além disso,

nesta mesma análise, dosamos as interleucinas regulatórias IL-10 e IL-17. Para isto, as células do baço e linfonodos dos animais imunizados foram reestimuladas *in vitro* com a proteína $P1_{39-512}$. Como podemos observar na **figura 15 A** e **B**, foram detectados níveis homogêneos das citocinas IL-6 e IFN-γ proveniente dos esplenócitos dos camundongos imunizados com esporos das linhagens recombinantes (LDV702 e LDV704) ou com a linhagem selvagem 10112, seguido de duas doses reforço da proteína $P1_{39-512}$. Esse resultado demonstra, mais uma vez, o perfil de resposta misto Th1/Th2 induzido após a administração das diferentes formulações vacinais. O mesmo fenômeno foi observado nas análises de IL-10 e IL-17 (**Figura 15 C** e **D)**. Não fomos capazes e detectar essas citocinas nos linfonodos dos animais imunizados.

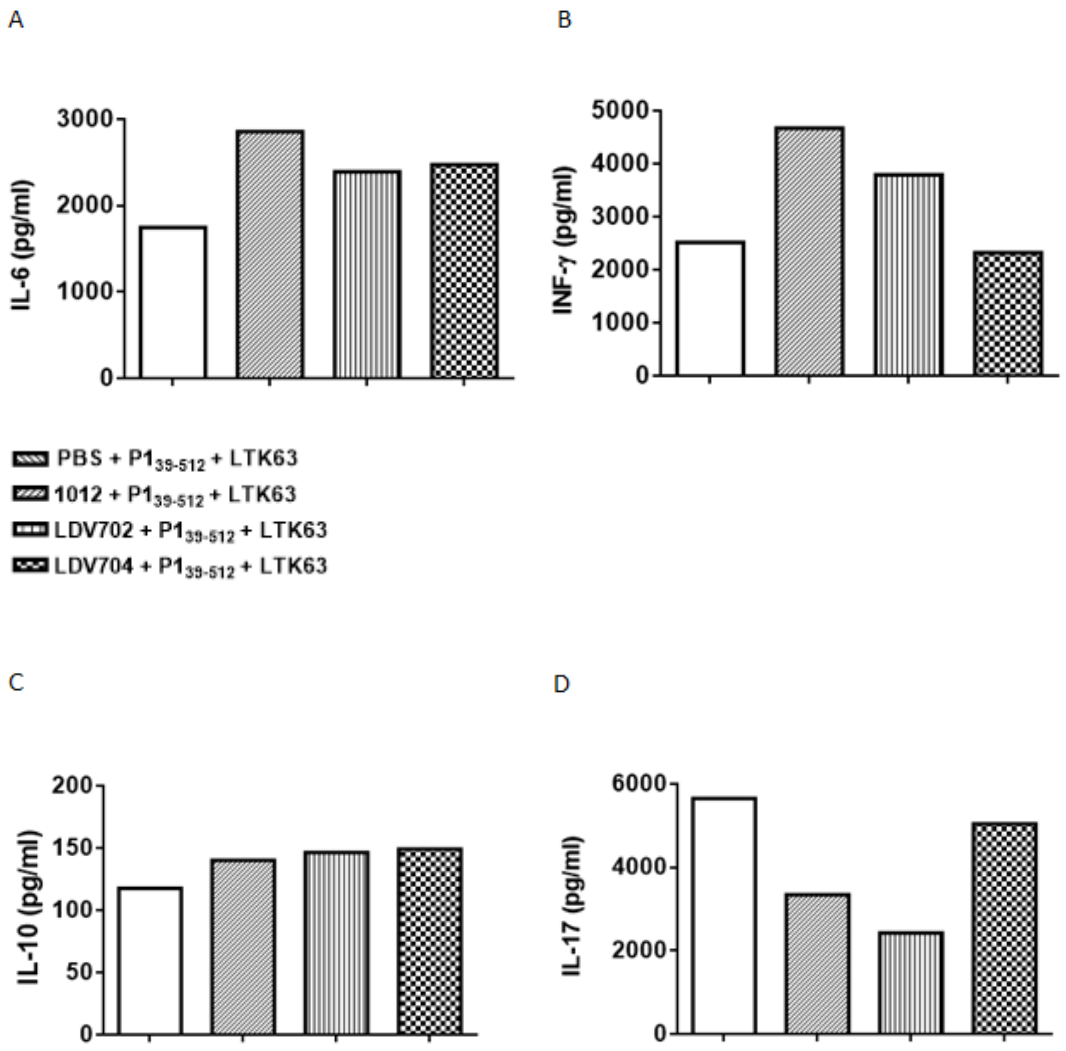
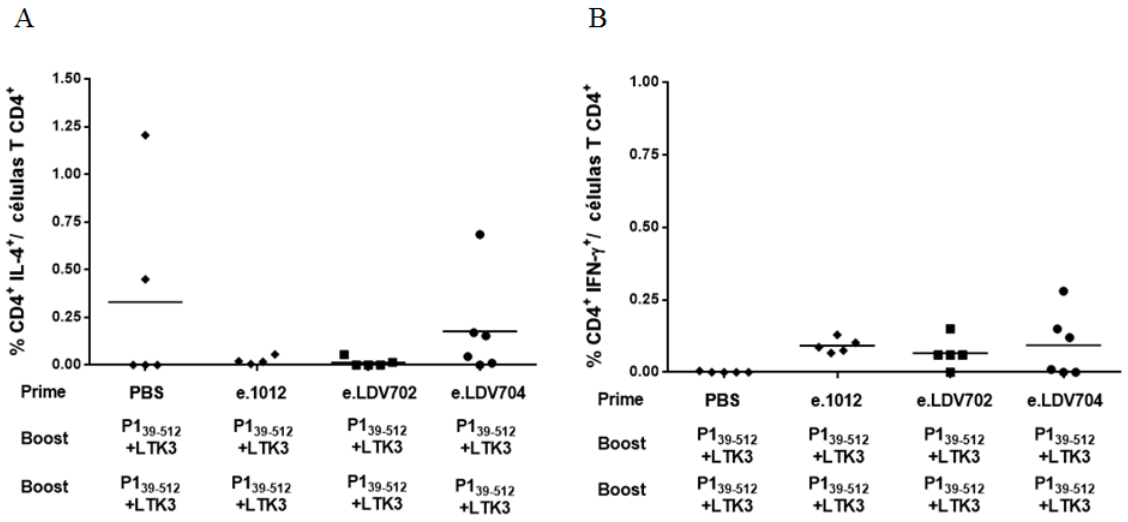


Figure 15 - Análise da produção de citocinas IL-6, IFN-γ, IL-10 e IL-17 após o regime vacinal dose-reforço heterólogo de 3 doses. Sobrenadante de células do baço e LNCs foram estimulados in vitro por 72 horas com (5 µg) a proteína $P1_{39-512}$. As amostras foram analisadas por ensaio de CBA (Cytometricbeadsassay), conforme as instruções do fabricante.

4.13 Avaliação da resposta imune celular $P1_{39-512}$ específica

Como vimos anteriormente, o regime vacinal empregado exultou na modulação para os dois braços da resposta imune (Th1/Th2), com isso, na etapa final do trabalho, resolvemos avaliar se as imunizações com os esporos de diferentes linhagens de *B. subtilis* (1012, LDV702 e LDV704) mais duas doses reforço com a proteína $P1_{39-512}$, coadministradas com o adjuvante LTK63, seriam capazes de ativar respostas de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtoras de IL-4 ou IFN-γ. Como podemos observar na **figura 16 A e B**, a porcentagem de linfócitos T $CD4^+$ produtores de IL-4 ou IFN-γ foi semelhante àquela observada nos grupos imunizados com as diferentes linhagens de *B. subtilis* (primeira dose) e os animais do grupo controle (PBS na primeira dose). O mesmo padrão de resposta foi observado quando analisamos a ativação de linfócitos T $CD8^+$ produtores de IFN-γ **(Figura 16 C).** Esses resultados indicam, portanto, que as diferentes formulações vacinais apresentaram baixa eficiência na ativação de linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$.



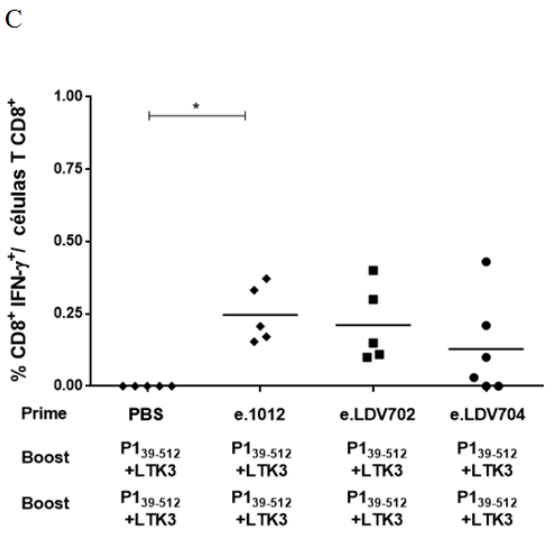


Figura 16 - Avaliação *in vitro* de linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ produtores de IL-4 e IFN-γ após 16 horas de estimulação *in vitro* dos esplenócitos dos animais imunizados com a $P1_{39-512,}$ Os resultados estão apresentados na forma de porcentagem de células ativadas sobre o total de linfócitos TCD4+ ou TCD8+ (100.000 células) cada. As amostras de baço foram coletadas três semanas após a última dose e analisadas por citometria de fluxo.

Após o regime vacinal, fizemos análises de IgA na saliva, por meio de ensaio de ELISA, e avaliamos também a indução de células produtoras de IgA utilizando ensaios de ELISPOT. No entanto, nas condições de imunização e experimentação não foi possível observar a IgA na saliva, e nem a presença de células produtoras de IgA no sobrenadante de esplenócitos dos animais imunizados.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho tivemos como objetivo avaliar uma nova estratégia vacinal administrada pela via sublingual e testada em esquema de sensibilização e reforço (prime-boost) heterólogo contra o patógeno *S. mutans*, considerado o agente primordial no desenvolvimento da cárie dental em humanos. Utilizamos como antígeno alvo a proteína recombinante $P1_{39-512}$ tanto na forma de proteína purificada como expressa em veículos vivos para entrega do antígeno. Em particular, empregamos a linhagem recombinante de *B. subtilis* LDV702, que expressa a proteína após germinação do esporo, bem como a linhagem LDV704 que, além de expressar a proteína na fase de germinação expressa também uma proteína recombinante na capa do esporo (invasina) que permite um trânsito mais lento do esporo pelo trato intestinal de camundongos. Além disso, avaliamos também a proteína LTK63 como adjuvante vacinal co-administrada pela via sublingual. Os ensaios foram planejados de forma a demonstrar a capacidade dos esporos recombinantes de *B. subtilis* em "primar" o sistema imune de mucosa para o antígeno alvo e, portanto, ampliar as respostas imunológicas geradas após doses de reforço empregando a proteína recombinante purificada, administrada pela via sublingual.

Após o regime vacinal administrado em três doses, avaliamos as respostas imunes humorais induzidas pelas diferentes formulações vacinais em dois blocos. No primeiro bloco, apresentamos os resultados obtidos após administração com os esporos recombinantes (LDV702 ou LDV 704), seguido por duas doses da proteína $P1_{39-512}$ sem a presença do adjuvante. No segundo bloco foi feita a imunização com as mesmas formulações, porém na presença do adjuvante LTK63 na segunda e terceira dose.

Inicialmente, questionamos se o regime dose-reforço heterólogo sem a presença do adjuvante seria capaz de potencializar a resposta de anticorpos antígeno-específicos após administração pela via sublingual. Ao analisarmos os resultados de ambos os regimes administrados em sensibilização e reforço heterólogo, vimos que todas as formulações mostraram-se capazes de induzir anticorpos IgG $P1_{39-512}$ específicos. Os grupos (descritos nos blocos 1 e 2) que receberam as formulações contendo esporos 1012 ou PBS na primeira dose e a proteína $P1_{39-512}$ nos dois últimos reforços, associado ou não ao adjuvante LTK63,desenvolveram títulos de anticorpos apenas após a segunda dose de reforço. Por outro lado, a imunização com esporos recombinantes que codificavam para $P1_{39-512}$ levou à produção de anticorpos específicos após a primeira dose de reforço. Esses resultados indicam a eficiência dos esporos das linhagens

recombinantes (LDV702 e LDV704) em induzir respostas imunológicas. Resultado semelhante foi observado por Tavares e colaboradores (2014), onde foi possível observar a detecção de anticorpos sistêmicos utilizando os esporos das mesmas linhagens por via sublingual em regime de sensibilização e reforço homólogo. As linhagens utilizadas expressam o antígeno vacinal somente após a germinação dos esporos, e isto pode ocorrer após a fagocitose destes no interior de células imunológicas, onde serão processados e apresentados para o sistema imune.

Ao compararmos os títulos de anticorpos específicos gerados, observamos que o adjuvante LTK63 foi fundamental para a potencialização das respostas imunológicas como confirmado pelo aumento significativo de anticorpos sistêmicos nos grupos que receberam a proteína em coadministração com adjuvante (Bloco-2) em relação àqueles que receberam apenas a proteína sem adjuvante nas duas doses (Bloco-1). Os resultados indicam que a sensibilização de respostas de anticorpos por meio de esporos recombinante *B subtilis* não se mostrou eficiente, mas a incorporação do adjuvante LTK63 aumentou de forma significativa a geração de anticorpos específicos contra a proteína $P1_{39\text{-}512}$.

Outro parâmetro interessante demonstrado nas análises da resposta imune humoral induzida pelos dois regimes vacinais foi o perfil de subclasses de IgG. Observamos que nos grupos imunizados com as formulações sem a presença do adjuvante apenas a subclasse IgG1 foi detectada, sendo portanto, indicativo de um perfil de resposta imune do tipo Th2. Ao analisarmos as subclasses dos grupos que receberam as formulações combinadas com o adjuvante, percebemos que houve uma modulação da resposta imune para um perfil de resposta mista, Th1/Th2, com a detecção das subclasses IgG1/IgG2a. Esse mesmo perfil de resposta foi observado por Batista e colaboradores (2014) onde a administração da $P1_{39\text{-}512}$ pela via subcutânea associada com outro mutante de LT, LTK4R, foi capaz de modular a resposta para um perfil balanceado, Th1/Th2, em comparação com animais imunizados com proteína. Isso indica que o padrão de resposta induzido pela proteína $P1_{39\text{-}512}$ associada à LT promove um perfil de resposta misto. Nas condições testadas, as via sublingual e subcutânea aparentemente não influenciaram o perfil de subclasses dos anticorpos gerados. Além disso, outros trabalhos têm demostrado que o padrão de resposta imunológica induzido pela LTK63 é do tipo Th1 (RYAN et al., 2000; RODRIGUES et al., 2011). Sabe-se que os esporos de *B. subtilis* podem atuar também como adjuvantes, direcionando para um

perfil de resposta balanceado Th1/Th2 (BARNES et al., 2007; LUIZ et al., 2008; DE SOUZA et al., 2014). No entanto, os resultados obtidos neste trabalho, permitem inferir que a modulação das respostas apresentadas pode estar relacionada com o elo antígeno, assim como pelo adjuvante LTK63.

A fim de confirmar o perfil das respostas imunológicas induzidas após a administração das diferentes formulações vacinais empregadas neste trabalho, avaliamos a produção das citocinas IL-6, IFN-γ, IL-10, IL-17 no sobrenadante de esplenócitos estimulados *in vitro*. Nos grupos dos animais imunizados sem o adjuvante LTK63, ao contrário do observado com o perfil indicado pelas análises de subclasses, a avaliação de citocinas mostrou um perfil de resposta distinta. Nos animais imunizados com esporos da linhagem LDV702 (primeira dose) e a proteína $P1_{39-512}$ (segundo e terceiro reforço) observamos um perfil de resposta misto (Th1/Th2) com a detecção de níveis equilibrados das citosinas IL-6 e IFN-γ. Porém, nos animais imunizados com esporos selvagem 1012 (primeira dose) e com a proteína (segundo e terceiro reforço) evidenciamos um padrão Th1, pois a citocina com os maiores níveis de detecção foi o IFN-γ. Por outro lado, para o grupo que recebeu os esporos da linhagem LDV704 (primeira dose) e a proteína $P1_{39-512}$ (segundo e terceiro reforço), a resposta imune induzida foi sugestiva de um perfil Th2, como demonstrado pela análise de subclasses.

Em relação aos grupos que receberam as formulações contendo o adjuvante LTK63 foi evidenciado um padrão de resposta mista, Th1/Th2, corroborando resultados das análises de subclasses de IgG, descritos anteriormente. Além disso, dosamos a citocina IL-10 e verificamos a presença da mesma nos sobrenadante de células de baço de todos os camundongos imunizados. A IL-10 é produzida principalmente por células Th2, atua na regulação de outras citocinas, inclusive inibindo a ativação de células Th1 (REDFORD; MURRAY; O'GARRA, 2011). Detectamos também a IL-17 quando as formulações vacinais foram administradas na presença do adjuvante ou após a administração dos esporos de *B. subitilis* 1012 com a proteína. Em um estudo realizado por Brereton e colaboradores (2011), foi demonstrado que concentrações distintas de LT e de LTK63 induzem a produção da citocina IL-17, sendo esta indicativa de um perfil de resposta Th17. Esse perfil de resposta está relacionada à imunidade protetora contra infecções bacterianas. O padrão de citocinas evidenciado nos nossos resultados é característico do tipo de resposta induzida pelo adjuvante LTK63 (IL-6, IL-10, IFN-γ,

IL-17). Em um estudo realizado por STASIŁOJĆ e colaboradores (2015) foi demonstrado que o emprego de esporos recombinantes levou a respostas direcionadas para um perfil Th1/Th17.

Nas análises qualitativas das respostas humorais, vimos que os anticorpos induzidos após a imunização com as diferentes formulações vacinais reconheceram epítopos conformacionais e lineares presentes no fragmento $P1_{39-512}$, e esse reconhecimento foi melhor nos grupos imunizados com a presença do adjuvante LTK63. Esses resultados corroboram dados gerados por Batista e colaboradores (2014) que demonstraram o mesmo fenômeno de reatividade dos soros gerados frente ao reconhecimento de epítopos presente na proteína $P1_{39-512}$. Além disso, os anticorpos anti-$P1_{39-512}$ específicos dos animais imunizados com as formulações na presença do adjuvante foram capazes de reconhecer a proteína P1 nativa presente na superfície de diferentes linhagens do *S. mutans*, porém com títulos menores do que aqueles obtidos com o fragmento $P1_{39-512.}$ Logo, essas análises demonstram a existência de epítopos lineares e conformacionais dispostos na proteína recombinante, com prevalência dos epitopos linheares. A diferença entre o reconhecimento da proteína recombinante $P1_{39-512}$ e da proteína nativa presente na superfície de diferentes linhagens do *S. mutans* por anticorpos gerados após imunização estaria associada a diferenças na conformação e, consequentemente, nos epítopos da proteína recombinante em relação à proteína nativa.

Também nos perguntamos, se o adjuvante utilizado alteraria a afinidade de ligação dos anticorpos ao antígeno entre as diferentes formulações, por meio do teste de avidez dos anticorpos anti-$P1_{39-512}$. Observamos que os anticorpos induzidos pelas formulações administradas com o adjuvante LTK63 mostraram avidez semelhante para o antígeno. Esse resultado demonstra que a imunização com esporos recombinantes associados ao adjuvante não afeta de forma significativa a afinidade dos anticorpos gerados entre as formulações, indicando que as mesmas apresentam potencial semelhante em relação a esse parâmetro funcional.

A proposta vacinal baseada no regime sensibilização e reforço heterólogo na ausência do adjuvante LTK63 demonstrou uma baixa eficiência na indução de respostas imunes humorais antígeno-específica. Dessa forma, procuramos avaliar se essas formulações estariam modulando para uma resposta imunológica de base celular. Assim como foi analisadas por outros trabalhos utilizando esporos ou LTs (WILLIAMS et al.,

2004; BARNES et al., 2007). Neste trabalho, analisamos ativação de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtoras das citocinas IL-4 ou IFN-γ. Nossos resultados demonstram que nenhuma das formulações empregadas levou à ativação de respostas celulares envolvendo linfócitos T. Resultados semelhantes foram obtidos após as imunizações com as formulações que continham o adjuvante LTK63. Esses resultados deixam claro que a imunização pela via sublingual com as formulações vacinais testadas não se mostra eficaz na ativação de respostas mediadas por linfócitos T.

As duas linhagens recombinantes de *B. subtilis* (LDV702 e LDV704), utilizadas neste trabalho foram previamente construídas por nosso grupo de pesquisa, com o propósito de expressar a proteína $P1_{39\text{-}512}$ durante a fase de germinação. A linhagem LDV704 foi planejada também para direcionar o alvo vacinal para células M, que possuem receptores β1 de integrina, promovendo o aumento da captura do antígeno por essas células presentes em mucosas. No presente trabalho, após a administração dos esporos dessas linhagens em regime de sensibilização e reforço heterólogo, pela via sublingual, não foram observadas diferenças estatísticas na indução de anticorpos anti-$P1_{39\text{-}512}$ específicos nos animais imunizados com essas linhagens separadamente. Esses resultados corroboram dados obtidos por Tavares e colaboradores (2014), quando as mesmas linhagens foram testadas utilizando a via sublingual, no entanto, em regime homólogo. No mesmo estudo também foi observado que, ao serem administrados pelas vias oral ou intranasal, os esporos da linhagem LDV704 mostram-se mais eficientes na ativação do sistema imune do que os da linhagem LDV702 (TAVARES BATISTA et al., 2014). Esses resultados indicavam que o mecanismo de direcionamento do antígeno para células do tecido intestinal (GALT) e do tecido linfoide associado à mucosa nasal (NALT), as quais contem receptores de integrina (DORNER et al., 2010). Os resultados observados após imunização pela via sublingual indicam que essa via não se mostra eficiente nas imunizações feitas com esporos recombinantes e sugerem a ausência ou não acessibilidade de células que expressem receptores para a invasina codificada pela linhagem 704.

A via sublingual compreende uma grande área de absorção para antígenos, que, ao serem entregues, podem ativar células dendríticas presentes no tecido local, ou podem ser absorvidos diretamente para a circulação sanguínea (AMUGUNI et al., 2012). Em alguns trabalhos, a utilização dessa via de imunização mostrou resultados promissores com a indução de anticorpos sistêmicos e de mucosa contra diferentes

antígenos (ÇUBURU et al., 2007; AMUGUNI et al., 2011, 2012). Em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, a via sublingual foi explorada para a administração de alguns antígenos de *S. mutans*, dentre eles, a proteína $P1_{39-512}$. Como resultado, foi verificado que essa via de imunização demonstrou ser um local promissor na ativação d respostas imunes humorais com indução de altos níveis de anticorpos IgG-específicos (TAVARES BATISTA et al., 2014; FERREIRA et al., 2016). Os resultados obtidos ao longo do trabalho revelaram que, ao contrário de outras vias de mucosa, a via sublingual não se revelou ser eficiente na montagem de respostas imunológicas específicas em regimes vacinais do tipo sensibilização e reforço em condições nas quais esporos recombinantes de *B. subtilis* foram empregados como estímulo sensibilizador (priming). No entanto, a utilização de um adjuvante de mucosa (LT), co-administrado nas doses de reforço com a proteína recombinante purificada, levou a um significativo aumento nas respostas de anticorpos específicos. De um modo geral, os resultados expandem o conhecimento a cerca do potencial vacinal da via sublingual e sobre esporos recombinantes de *B. subtilis*.

O regime vacinal sensibilização e reforço heterólogo empregado neste trabalho é uma estratégia que permite a combinação de diferentes sistemas para a apresentação do antígeno alvo com a finalidade de obter respostas imunológicas protetoras. Essa estratégia foi apresentada em muitos trabalhos como uma alternativa promissora para o aumento da imunogenicidade de antígenos em várias formulações vacinais (CIABATTINI et al., 2004; LASARO et al., 2005; DALMIA; RAMSAY, 2012). No entanto, é importante ressaltar que vários fatores podem influenciar no desempenho da indução de respostas imunológicas após um regime vacinal, como a ordem e as vias pelas quais as formulações são administradas, assim como o antígeno empregado, bem como, a natureza do vetor ou o tipo de adjuvante utilizado (LU, 2009; NASCIMENTO; LEITE, 2012). Nos resultados obtidos neste trabalho, com o emprego do regime sensibilização e reforço heterólogo, não foram obtidas evidências de ativação de respostas imunológicas específicas, particularmente em mucosas, com esporos de *B. subtilis*. Entretanto, as formulações em associação com o adjuvante LTK63 foram capazes de potencializar respostas sistêmicas de anticorpos. Assim, a exploração dessa estratégia vacinal para antígenos de *S. mutans* permanece como uma alternativa promissora, porém desafiadora, para o desenvolvimento de vacinas para a prevenção da cárie dental.

6 CONCLUSÕES

- Todas as formulações empregadas em esquemas de sensibilização e reforço heterólogo mostraram-se capazes de ativar resposta de IgG anti-$P1_{39-512}$.

- Os grupos imunizados com as formulações na presença do adjuvante LTK63 induziram resultados significativos nas respostas de anticorpos sistêmicos.

- O regime vacinal de sensibilização e reforço heterólogo não induziu resposta IgA específica em mucosas nas condições testadas.

- A coadministração do antígeno com o adjuvante LTK63 potencializou as respostas imunes sistêmicas, e também aumentou a quantidade de anticorpos gerados e com capacidade de reconhecer o antígeno recombinante presente na proteína expressa na superfície da bactéria.

- Os esporos de *B. subtilis*, utilizados como veículos vivos para a apresentação do antígeno, representam uma plataforma promissora na entrega de antígenos vacinais, uma vez que possuem a capacidade de preservar o antígeno transportado, mostram-se seguros para a administração em seres humanos e possuem baixo custo de produção.

REFERÊNCIAS*

AMUGUNI, H.; LEE, S.; KERSTEIN, K.; BROWN, D.; BELITSKY, B.; HERRMANN, J.; KEUSCH, G.; SONENSHEIN, A.; TZIPORI, S. Sublingual immunization with an engineered Bacillus subtilis strain expressing tetanus toxin fragment C induces systemic and mucosal immune responses in piglets. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 5, p. 447–456, maio 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22198093>. Acesso em: 20 nov. 2017.

AMUGUNI, J. H.; LEE, S.; KERSTEIN, K. O.; BROWN, D. W.; BELITSKY, B. R.; HERRMANN, J. E.; KEUSCH, G. T.; SONENSHEIN, A. L.; TZIPORI, S. Sublingually administered Bacillus subtilis cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. **Vaccine**, v. 29, n. 29–30, p. 4778–4784, 24 jun. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21565244>. Acesso em: 20 nov. 2017.

APS, L. R. M. M.; DINIZ, M. O.; PORCHIA, B. F. M. M.; SALES, N. S.; MORENO, A. C. R.; FERREIRA, L. C. S. Bacillus subtilis spores as adjuvants for DNA vaccines. **Vaccine**, v. 33, n. 20, p. 2328–2334, 11 maio 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25819710>. Acesso em: 25 nov. 2017.

BALAKRISHNAN, M.; SIMMONDS, R. S.; TAGG, J. R. Dental caries is a preventable infectious disease. **Australian dental journal**, v. 45, n. 4, p. 235–45, dez. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11225524>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BANAS, J. A. Virulence properties of Streptococcus mutans. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 9, p. 1267–77, 1 maio 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14977543>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BARNES, A. G. C.; CEROVIC, V.; HOBSON, P. S.; KLAVINSKIS, L. S. Bacillus subtilis spores: A novel microparticle adjuvant which can instruct balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 6, p. 1538–1547, 2007.

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

BATISTA, M. T.; SOUZA, R. D.; FERREIRA, E. L.; ROBINETTE, R.; CROWLEY, P. J.; RODRIGUES, J. F.; BRADY, L. J.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Immunogenicity and in vitro and in vivo protective effects of antibodies targeting a recombinant form of the Streptococcus mutans P1 surface protein. **Infection and immunity**, v. 82, n. 12, p. 4978–88, dez. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25225243>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BRADY, L. J.; MADDOCKS, S. E.; LARSON, M. R.; FORSGREN, N.; PERSSON, K.; DEIVANAYAGAM, C. C.; JENKINSON, H. F. The changing faces of Streptococcus antigen I/II polypeptide family adhesins. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 276–286, 24 maio 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497507>. Acesso em: 19 nov. 2017.

BRADY, L. J.; PIACENTINI, D. A.; CROWLEY, P. J.; OYSTON, P. C.; BLEIWEIS, A. S. Differentiation of salivary agglutinin-mediated adherence and aggregation of mutans streptococci by use of monoclonal antibodies against the major surface adhesin P1. **Infection and immunity**, v. 60, n. 3, p. 1008–17, mar. 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1541515>. Acesso em: 19 nov. 2017.

CIABATTINI, A.; PARIGI, R.; ISTICATO, R.; OGGIONI, M. R.; POZZI, G. Oral priming of mice by recombinant spores of Bacillus subtilis. **Vaccine**, v. 22, n. 31–32, p. 4139–4143, 2004.

CLARK, M. A.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. A. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of Yersinia pseudotuberculosis to mouse Peyer's patch M cells. **Infection and immunity**, v. 66, n. 3, p. 1237–43, mar. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488419>. Acesso em: 19 nov. 2017.

CRITCHLEY-THORNE, R. J.; STAGG, A. J.; VASSAUX, G. Recombinant Escherichia coli Expressing Invasin Targets the Peyer's Patches: the Basis for a Bacterial Formulation for Oral Vaccination. **Molecular Therapy**, v. 14, n. 2, p. 183–191, ago. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16581299>. Acesso em: 19 nov. 2017.

CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; PIACENTINI, D. A.; BLEIWEIS, A. S. **Identification of a salivary agglutinin-binding domain within cell surface adhesin P1 of Streptococcus mutansInfection and Immunity**, 1993. .

ÇUBURU, N.; KWEON, M.-N.; SONG, J.-H.; HERVOUET, C.; LUCI, C.; SUN, J.-B.; HOFMAN, P.; HOLMGREN, J.; ANJUÈRE, F.; CZERKINSKY, C. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. **Vaccine**, v. 25, n. 51, p. 8598–8610, 12 dez. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17996991>. Acesso em: 20 nov. 2017.

DALMIA, N.; RAMSAY, A. J. Prime-boost approaches to tuberculosis vaccine development. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 10, p. 1221–33, 2012.

DE ALENCAR, B. C. G.; PERSECHINI, P. M.; HAOLLA, F. A.; DE OLIVEIRA, G.; SILVERIO, J. C.; LANNES-VIEIRA, J.; MACHADO, A. V.; GAZZINELLI, R. T.; BRUNA-ROMERO, O.; RODRIGUES, M. M. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, Trypanosoma cruzi, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4383–4395, 2009.

DE SOUZA, R. D.; BATISTA, M. T.; LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C. M.; AMORIM, J. H.; BIZERRA, R. S. P.; MARTINS, E. G.; DE SOUZA FERREIRA, L. C. Bacillus subtilis spores as vaccine adjuvants: Further insights into the mechanisms of action. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

DORNER, M.; ZUCOL, F.; ALESSI, D.; HAERLE, S. K.; BOSSART, W.; WEBER, M.; BYLAND, R.; BERNASCONI, M.; BERGER, C.; TUGIZOV, S.; SPECK, R. F.; NADAL, D. Beta1 integrin expression increases susceptibility of memory B cells to Epstein-Barr virus infection. **Journal of virology**, v. 84, n. 13, p. 6667–77, 2010.

DUC, L. H.; HONG, H. A.; FAIRWEATHER, N.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infection and immunity**, v. 71, n. 5, p. 2810–8, maio 2003a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704155>. Acesso em: 19 nov. 2017.

DUC, L. H.; HONG, H. A.; FAIRWEATHER, N.; RICCA, E.; CUTTING, S. M.

Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infection and immunity**, v. 71, n. 5, p. 2810–8, maio 2003b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704155>.Acesso em: 19 nov. 2017.

ERUME, J.; PARTIDOS, C. Evaluation of the LTK63 adjuvant effect on cellular immune responses to measles virus nucleoprotein. **African health sciences**, v. 11, n. 2, p. 151–157, 2011.

FERREIRA, E. L.; BATISTA, M. T.; CAVALCANTE, R. C. M.; PEGOS, V. R.; PASSOS, H. M.; SILVA, D. A.; BALAN, A.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Sublingual immunization with the phosphate-binding-protein (PstS) reduces oral colonization by Streptococcus mutans. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 5, p. 410–422, 2016.

FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C.; SCHUMANN, W. Bacillus subtilis as a tool for vaccine development: From antigen factories to delivery vectors. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 77, n. 1, p. 113–124, 2005.

FOERSTER, H. F.; FOSTER, J. W. Endotrophic calcium, strontium, and barium spores of Bacillus megaterium and Bacillus cereus. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 3, p. 1333–1345, 1966.

HAJISHENGALLIS, G.; KOGA, T.; RUSSELL, M. W. Affinity and Specificity of the Interactions between Streptococcus mutans Antigen I/II and Salivary Components. **Journal of Dental Research**, v. 73, n. 9, p. 1493–1502, 8 set. 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523469>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HAJISHENGALLIS, G.; RUSSELL, M. W.; MICHALEK, S. M. Comparison of an adherence domain and a structural region of Streptococcus mutans antigen I/II in protective immunity against dental caries in rats after intranasal immunization. **Infection and immunity**, v. 66, n. 4, p. 1740–3, abr. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529105>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HU, S. L.; ABRAMS, K.; BARBER, G. N.; MORAN, P.; ZARLING, J. M.; LANGLOIS, A. J.; KULLER, L.; MORTON, W. R.; BENVENISTE, R. E. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. **Science (New York, N.Y.)**, v. 255, n. 5043, p. 456–9, 24 jan. 1992. Disponível

em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1531159>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HUANG, Y.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M. Induction of ProtectiveImmunity against Streptococcus mutans Colonization after Mucosal Immunization with Attenuated Salmonella enterica Serovar Typhimurium Expressing an S. mutans Adhesin under the Control of In Vivo-Inducible nirB Promoter. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 2154–2161, 1 abr. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254570>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HUGHES, M.; MACHARDY, S. M.; SHEPPARD, A. J.; WOODS, N. C. Evidence for an immunological relationship between Streptococcus mutans and human cardiac tissue. **Infection and immunity**, v. 27, n. 2, p. 576–88, fev. 1980a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6991419>. Acesso em: 25 nov. 2017.

HUGHES, M.; MACHARDY, S. M.; SHEPPARD, A. J.; WOODS2, N. C. Evidence for an Immunological Relationship Between Streptococcus mutans and Human Cardiac Tissue. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 27, n. 2, p. 576–588, 1980b. Disponível em:<http://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC550804&blobtype=pdf>. Acesso em: 19 nov. 2017.

HUIMIN, Y. SCIENCE CHINA SPECIAL TOPIC: Impaired immune response and immunologic adjuvants Salivary IgA enhancement strategy for development of a nasal-spray anti-caries mucosal vaccine. v. 56, n. 5, p. 406–413, 2013. Disponível em: <www.springer.com/scp>. Acesso em: 19 nov. 2017.

IDONE, V.; BRENDTRO, S.; GILLESPIE, R.; KOCAJ, S.; PETERSON, E.; RENDI, M.; WARREN, W.; MICHALEK, S.; KRASTEL, K.; CVITKOVITCH, D.; SPATAFORA, G. Effect of an orphan response regulator on Streptococcus mutans sucrose-dependent adherence and cariogenesis. **Infection and immunity**, v. 71, n. 8, p. 4351–60, 1 ago. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12874312>. Acesso em: 19 nov. 2017.

ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; TRAN, H. T.; CIABATTINI, A.; MEDAGLINI, D.; OGGIONI, M. R.; DE FELICE, M.; POZZI, G.; RICCA, E. Surface Display of Recombinant Proteins on Bacillus subtilis Spores. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6294–6301, 1 nov. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591673>. Acesso em: 19 nov. 2017.

JENKINSON, H. F.; DEMUTH, D. R. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. **Molecular microbiology**, v. 23, n. 2, p. 183–90, jan. 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9044252>. Acesso em: 19 nov. 2017.

JORDAN, H. V.; KRASSE, B.; MÖLLER, A. A method of sampling human dental plaque for certain "caries-inducing" streptococci. **Archives of Oral Biology**, v. 13, n. 8, p. 919–927, 1968.

KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M. I.; JEON, J. G. Exopolysaccharides Produced by Streptococcus mutans Glucosyltransferases Modulate the Establishment of Microcolonies within Multispecies Biofilms. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3024–3032, 15 jun. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233920>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LARSON, M. R.; RAJASHANKAR, K. R.; PATEL, M. H.; ROBINETTE, R. A.; CROWLEY, P. J.; MICHALEK, S.; BRADY, L. J.; DEIVANAYAGAM, C. Elongated fibrillar structure of a streptococcal adhesin assembled by the high-affinity association of - and PPII-helices. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 13, p. 5983–5988, 2010. Disponível em: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912293107>.

LASARO, M. O.; LUIZ, W. B.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, L. C. S. Prime-boost vaccine regimen confers protective immunity to human-derived enterotoxigenic Escherichia coli. **Vaccine**, v. 23, n. 19, p. 2428–2436, 2005.

LAVELLE, E. C.; O'HAGAN, D. T. Delivery systems and adjuvants for oral vaccines. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 3, n. 6, p. 747–762, nov. 2006. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/17425247.3.6.747>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LEHNER, T.; CHALLACOMBE, S. J.; CALDWELL, J. Oral immunization with Streptococcus mutants in rhesus monkeys and the development of immune response and dental caries. **Immunology**, v. 41, n. 4, p. 857–64, dez. 1980. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7461713>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LEHNER, T.; RUSSELL, M. W.; CALDWELL, J.; SMITH, R. Immunization with

purified protein antigens from Streptococcus mutans against dental caries in rhesus monkeys. **Infection and immunity**, v. 34, n. 2, p. 407–15, nov. 1981. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7309233>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LEMOS, J. A.; QUIVEY, R. G.; KOO, H.; ABRANCHES, J.; ABRANCHES, J. Streptococcus mutans: a new Gram-positive paradigm? **Microbiology (Reading, England)**, v. 159, n. Pt 3, p. 436–45, mar. 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23393147>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LEVINE, M.; OWEN, W. L.; AVERY, K. T. Antibody response to actinomyces antigen and dental caries experience: implications for caries susceptibility. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 6, p. 764–9, jun. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15939752>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LI, S.; RODRIGUES, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J. R.; ESTEBAN, M.; PALESE, P.; NUSSENZWEIG, R. S.; ZAVALA, F. Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. June, p. 5214–5218, 1993.

LILJEQVIST, S.; CANO, F.; NGUYEN, T. N.; UHLÉN, M.; ROBERT, A.; STÅHL, S. Surface display of functional fibronectin-binding domains on Staphylococcus carnosus. **FEBS letters**, v. 446, n. 2–3, p. 299–304, 12 mar. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10100862>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LINTERMANS, P.; DE GREVE, H. Live bacterial vectors for mucosal immunization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, n. 1, p. 73–89, 15 dez. 1995. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169409X95000518>. Acesso em: 25 nov. 2017.

LU, S. Heterologous prime–boost vaccination. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 346–351, jun. 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19500964>. Acesso em: 19 nov. 2017.

LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C. M.; PACCEZ, J.; SOUZA, R. D.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Boosting systemic and

secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant Bacillus subtilis strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. **Vaccine**, v. 26, n. 32, p. 3998–4005, 2008.

MA, J. K.; HUNJAN, M.; SMITH, R.; KELLY, C.; LEHNER, T. An investigation into the mechanism of protection by local passive immunization with monoclonal antibodies against Streptococcus mutans. **Infection and immunity**, v. 58, n. 10, p. 3407–14, out. 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2401569>. Acesso em: 19 nov. 2017.

MAURIELLO, E. M. F.; DUC, L. H.; ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; HONG, H. A.; DE FELICE, M.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Display of heterologous antigens on the Bacillus subtilis spore coat using CotC as a fusion partner. **Vaccine**, v. 22, n. 9–10, p. 1177–1187, 2004.

MCGHEE; MICHALEK, S. M.; WEBB, J.; NAVIA, J. M.; RAHMAN, A. F.; LEGLER, D. W. Effective immunity to dental caries: protection of gnotobiotic rats by local immunization with Streptococcus mutans. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 114, n. 1 Pt 2, p. 300–5, jan. 1975. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/804000>. Acesso em: 19 nov. 2017.

MICHALEK, S. M.; CHILDERS, N. K. Development and Outlook for a Caries Vaccine Oral Biology and Medicine Development and Outlook for a Caries Vaccine. 1990. Disponível em: <http://cro.sagepub.com/>. Acesso em: 25 nov. 2017.

MOISSET, A.; SCHATZ, N.; LEPOIVRE, Y.; AMADIO, S.; WACHSMANN, D.; SCHÖLLER, M.; KLEIN, J. P. Conservation of salivary glycoprotein-interacting and human immunoglobulin G-cross-reactive domains of antigen I/II in oral streptococci. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 184–93, jan. 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8262626>. Acesso em: 19 nov. 2017.

NAKAI, M.; OKAHASHI, N.; OHTA, H.; KOGA, T. Saliva-binding region of Streptococcus mutans surface protein antigen. **Infection and immunity**, v. 61, n. 10, p. 4344–9, out. 1993. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8406823>. Acesso em: 19 nov. 2017.

NASCIMENTO, I. P.; LEITE, L. C. C. **Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategiesBrazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2012. .

PACCEZ, J. D.; LUIZ, W. B.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, R. C. C.; SCHUMANN, W.; FERREIRA, L. C. S. Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of Bacillus subtilis as a vector for antigen delivery. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2935–2943, 5 abr. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16503367>. Acesso em: 19 nov. 2017.

PALMA, C.; IONA, E.; GIANNONI, F.; PARDINI, M.; BRUNORI, L.; FATTORINI, L.; DEL GIUDICE, G.; CASSONE, A. The LTK63 adjuvant improves protection conferred by Ag85B DNA-protein prime-boosting vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection by dampening IFN-?? response. **Vaccine**, v. 26, n. 33, p. 4237–4243, 2008.

PETERSEN, P. E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 31 Suppl 1, p. 3–23, dez. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15015736>. Acesso em: 19 nov. 2017.

PULENDRAN, B.; AHMED, R. Translating innate immunity into immunological memory: Implications for vaccine development. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 849–863, 2006.

REDFORD, P. S.; MURRAY, P. J.; O'GARRA, A. The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 261–270, 2011.

RIGATO, P. O.; DE ALENCAR, B. C.; DE VASCONCELOS, J. R. C.; DOMINGUEZ, M. R.; ARA??JO, A. F.; MACHADO, A. V.; GAZZINELLI, R. T.; BRUNA-ROMERO, O.; RODRIGUES, M. M. Heterologous plasmid DNA prime-recombinant human adenovirus 5 boost vaccination generates a stable pool of protective long-lived CD8+ T effector memory cells specific for a human parasite, Trypanosoma cruzi. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 5, p. 2120–2130, 2011.

ROBINETTE, R. A.; HEIM, K. P.; OLI, M. W.; CROWLEY, P. J.; MCARTHUR, W.P.; BRADY, L. J. Alterations in immunodominance of Streptococcus mutans AgI/II: lessons learned from immunomodulatory antibodies. **Vaccine**, v. 32, n. 3, p. 375–82, 9 jan. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24252705>. Acesso em: 16 dez. 2017.

ROBINETTE, R. A.; OLI, M. W.; MCARTHUR, W. P.; BRADY, L. J. A therapeutic anti-Streptococcus mutans monoclonal antibody used in human passive protection trials influences the adaptive immune response. **Vaccine**, v. 29, n. 37, p. 6292–300, 26 ago. 2011b. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21704107>. Acesso em: 19 nov. 2017.

RODRIGUES, J. F.; MATHIAS-SANTOS, C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; AMORIM, J. H.; CABRERA-CRESPO, J.; BALAN, A.; FERREIRA, L. C. S. Functional diversity of heat-labile toxins (LT) produced by enterotoxigenic Escherichia coli: Differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) and LT4 (pLT). **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 7, p. 5222–5233, 2011a.

RUSSELL, M. W.; CHALLACOMBE, S. J.; LEHNER, T. Specificity of antibodies induced by Streptococcus mutans during immunization against dental caries. **Immunology**, v. 40, n. 1, p. 97–106, 1980. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=0007419244>.

RUSSELL, M. W.; LEHNER, T. Characterisation of antigens extracted from cells and culture fluids of Streptococcus mutans serotype c. **Archives of Oral Biology**, v. 23, n. 1, p. 7–15, 1978.

RYAN, E. J.; MCNEELA, E.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; O'NEILL, L.; MILLS, K. H. 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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 165, n. 10, p. 5750–9, 15 nov. 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11067933>. Acesso em: 19 nov. 2017.

SCHUMANN, W. **Production of Recombinant Proteins in Bacillus subtilisAdvances in Applied Microbiology**, 2007.

SHIVAKUMAR, K. M.; VIDYA, S. K.; CHANDU, G. N. Dental caries vaccine. **Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research**, v. 20, n. 1, p. 99–106, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336869>. Acesso em: 19 nov. 2017.

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. **Molecular biotechnology**, v. 57, n. 8, p. 685–91, ago. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25779639>. Acesso em: 17 dez. 2017.

SULLAN, R. M. A.; LI, J. K.; CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; DUFRÊNE, Y. F. Binding Forces of *Streptococcus mutans* P1 Adhesin. **ACS Nano**, v. 9, n. 2, p. 1448–1460, 24 fev. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671413>. Acesso em: 25 nov. 2017.

TALBMAN, M. A.; SMITH, D. J. Effects of local immunization with Streptococcus mutans on induction of salivary immunoglobulin A antibody and experimental dental caries in rats. **Infection and immunity**, v. 9, n. 6, p. 1079–91, jun. 1974. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4545425>. Acesso em: 19 nov. 2017.

TAUBMAN, M. A.; NASH, D. A. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 7, p. 555–563, 26 jul. 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16729013>. Acesso em: 19 nov. 2017.

TAVARES, M. B.; SILVA, B. M.; CAVALCANTE, R. C. M.; SOUZA, R. D.; LUIZ, W. B.; PACCEZ, J. D.; CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. 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 immunology and medical microbiology**, v. 59, n. 2, p. 131–42, 1 jul. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20402772>. Acesso em: 19 nov. 2017.

TAVARES, M. B.; SOUZA, R. D.; LUIZ, W. B.; CAVALCANTE, R. C. M.; CASAROLI, C.; MARTINS, E. G.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Bacillus subtilis Endospores at High Purity and Recovery Yields: Optimization of

Growth Conditions and Purification Method. **Current Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 279–285, 27 mar. 2013. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-012-0269-2>. Acesso em: 19 nov. 2017.

TAVARES BATISTA, M.; SOUZA, R. D.; PACCEZ, J. D.; LUIZ, W. B.; FERREIRA, E. L.; CAVALCANTE, R. C. M.; FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Gut Adhesive Bacillus subtilis Spores as a Platform for Mucosal Delivery of Antigens. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 4, p. 1414–1423, 1 abr. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24421038>. Acesso em: 19 nov. 2017.

VAN DE RIJN, I.; BLEIWEIS, A. S.; ZABRISKIE, J. B. Antigens in Streptococcus mutans cross reactive with human heart muscle. **Journal of dental research**, v. 55 Spec No, p. C59-64, abr. 1976. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/770525>. Acesso em: 25 nov. 2017.

WELLS, J. M.; ROBINSON, K.; CHAMBERLAIN, L. M.; SCHOFIELD, K. M.; LE PAGE, R. W. Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 70, n. 2–4, p. 317–30, out. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879413>. Acesso em: 25 nov. 2017.

WILLIAMS, A. E.; EDWARDS, L.; HUMPHREYS, I. R.; SNELGROVE, R.; RAE, A.; RAPPUOLI, R.; HUSSELL, T. Innate imprinting by the modified heat-labile toxin of Escherichia coli (LTK63) provides generic protection against lung infectious disease. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, p. 7435–7443, 2004.

WORSLEY, D. J.; MARSHMAN, Z.; ROBINSON, P. G.; JONES, K. Prevention of dental caries through the use of fl uoride – the WHO approach. **Community dental health**, v. 33, n. 1, p. 9–14, 2016.

YOUNG, V. B.; FALKOW, S.; SCHOOLNIK, G. K. The invasin protein of Yersinia enterocolitica: internalization of invasin-bearing bacteria by eukaryotic cells is associated with reorganization of the cytoskeleton. **The Journal of cell biology**, v. 116, n.1,p.197207,jan.1992.Disponívelem:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1730744>. Acesso em: 19 nov. 2017.

ZHANG, S. Dental caries and vaccination strategy against the major cariogenic pathogen, Streptococcus mutans. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 960–6, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24372246>. Acesso em: 19 nov. 2017.

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