

EWERTON LUCENA FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ESTRATÉGIA VACINAL CONTRA A  
CÁRIE DENTAL HUMANA BASEADA NA PROTEÍNA PstS DE *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  
2015

EWERTON LUCENA FERREIRA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ESTRATÉGIA VACINAL CONTRA A  
CÁRIE DENTAL HUMANA BASEADA NA PROTEÍNA PstS DE *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 original

São Paulo  
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Ferreira, Ewerton Lucena.

Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal contra a cárie dental humana baseada na proteína PstS de *Streptococcus mutans* / Ewerton Lucena Ferreira. -- São Paulo, 2015.

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

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

Versão do título para o inglês: Development of a new vaccine strategy against human dental caries based on the PstS protein of *Streptococcus mutans*.

1. *Streptococcus mutans* 2. Cárie dental 3. Vacinas 4. PstS 5. Vacinas de mucosa 6. Imunização sublingual I. Ferreira, Profa. Dra. Rita de Cassia Café II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB018/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Ewerton Lucena Ferreira.

Título da Dissertação: Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal contra a cárie dental humana baseada na proteína PstS de *Streptococcus mutans*.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

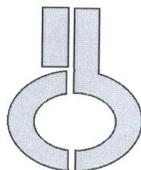
**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

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

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

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **037** nas fls. **05** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Luis Carlos de Souza Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal contra a cárie humana baseada na proteína PstS de Streptococcus mutans*" do qual participam o(s) aluno(s), **Milena Tavares Batista, Ewerton Lucena Ferreira e a pesquisadora Rita de Cássia Café Ferreira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **23.04.2013**, com **validade de 4 anos**.

São Paulo, 25 de abril de 2013.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE  
Secretária- CEUA - ICB/USP

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conduzir e iluminar meu caminho até este momento, me dando força e sabedoria para chegar ao final de mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Silvano Mendes e Maria Lucena, por me apoiarem desde a decisão de vir para São Paulo, por me receberem com tanto carinho todas as vezes que voltei pra casa, por serem meu porto seguro, meus exemplos e o que tenho de mais precioso.

À minha família, tios, primos, avó, padrinhos e aos amigos de Recife por sua torcida, orações e pelo aconchego em todas as minhas idas pra casa.

À Profa. Rita pelo carinho com o qual me recebeu, vindo de longe e sabendo de tão pouco. Obrigado por me ajudar a realizar esse sonho de estudar na Universidade de São Paulo, pela atenção e preocupação ao longo desse tempo.

À Milene (Mi) por enxergar em mim uma capacidade que nem eu mesmo via, por me encorajar a fazer sempre mais e melhor. Obrigado por dividir comigo sua experiência, por tantos conselhos e por me inspirar com o amor que você tem pelo que faz.

Ao Prof. Luís Carlos por compartilhar suas ideias e sua experiência de pesquisador em vários direcionamentos que este trabalho tomou.

Ao Rafael Ciro, grande baluarte da sapiência, que tanto me ajudou a resolver as “brincas” quando o assunto era proteína e por me mostrar que a pesquisa também pode ser leve e prazerosa.

Ao Roberto Nepomuceno por compartilhar comigo seu conhecimento teórico-prático sobre os transportadores ABCs e pela ajuda nos momentos iniciais.

À Profa. Dra. Andrea Balan e a Vanessa Pegos pelo auxílio nos ensaios estruturais que me encheram de confiança e abrilhantaram este trabalho.

Aos amigos do LDV que me receberam tão bem e me fizeram sentir não tão longe de casa em meio a tantos sotaques familiares.

Às amigas Naína e Mônica, por me receberem tão bem nos primeiros momentos no laboratório e me ensinarem tanto, além dos desabafos e papos descontraídos.

Aos que considero minha turma do mestrado, Rúbens Prince, Natiely Silva e Mariana Cintra, por compartilharem os sabores e dissabores em tantos momentos e pelas conversas que muitas vezes perdiam o senso de realidade.

Aos Bacileiros e Baciletas, de agora e outrora, Hélic, Dalva, Aislane, Giuliana, Sérgio, Victor, Laís, Gabriela e Gisela muito obrigado pela parceria em tantos experimentos, discussões de artigos, seminários e por me permitirem realizar o exercício de compartilhar meu conhecimento com vocês.

À Raíza, uma pessoa que sabe o significado da palavra amizade, obrigado por sua preocupação não só com a condução dos trabalhos, mas com o que está além do os olhos podem ver.

Ao pessoal das bancadas do corredor, atuais e egressos, Náina, Mônica, Raíza, Lennon, Sara, Robert, Roberto, Débora e Priscila, obrigado por compartilharem reagentes, força braçal, ideias, almoços e muitas risadas.

À Deni que muitas vezes me socorreu em meio aos experimentos, obrigado por estar sempre solícita a ajudar e pelo seu livro ata tão exemplar que espero um dia ter igual.

À Bruna, Jaime, Luana, Mari Diniz, Juliana e Jamile pela ajuda em diversos momentos e por compartilharem suas experiências e às mais recentes integrantes Carina, Carol e Laís, espero que se sintam tão bem quanto eu em trabalhar neste grupo.

Aos antigos membros do LDV Renata Damázio, Camila Santos, Wilson Barros, Debora Costa, Priscila Gomes, Cariri e Marcinha que me ajudaram de diferentes formas compartilhando suas experiências profissionais e de vida, não poderia esquecê-los.

Aos estagiários do LDV Mari Waligora, Adriano, André e Amanda com os quais compartilhei muitos conhecimentos.

Ao Eduardo Gimenes pela sua paciência em me ajudar a resolver as questões mais burocráticas do cotidiano no laboratório e pela sua organização e dedicação exemplar.

Ao apoio técnico de Loren, Lílian e atualmente Carol que permitiu agilidade em meio a protocolos muitas vezes tão demorados.

Aos funcionários do Biotério de Parasitologia pelo apoio com os animais, fundamental para realização de boa parte deste trabalho.

À Gisele Pereira por me ajudar a resolver todas as broncas da pós-graduação, sempre paciente e atenciosa em meio a minha ansiedade e correria.

Aos queridos amigos de vida que levo por onde for Priscila, Paulo e Rosângela, obrigado por seu apoio e palavras de encorajamento, e por manter essa amizade mesmo em meio à distância física.

Aos amigos-família que Deus colocou em meu caminho, a mocidade da IPP (UMP Pinheiros), com vocês me tornei um cidadão melhor, um cristão melhor e um amigo melhor.

A Filipe Mesquita, Raquel Madruga e Rutheane Madruga obrigado por me acolherem, aceitarem minha amizade, pelo carinho, preocupação e por tantas aventuras, vocês fazem parte da minha vida, são minha família.

Ao apoio financeiro da FAPESP que permitiu a realização e divulgação deste trabalho.

“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você for.”

Josué 1:9

## RESUMO

FERREIRA, E. L. **Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal contra a cárie dental humana baseada na proteína PstS de *Streptococcus mutans***. 2015. 63 f. Dissertação de (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

*Streptococcus mutans* é o principal agente etiológico da cárie dental humana, uma doença infecciosa com ampla distribuição mundial, para a qual não há vacina disponível apesar do conhecimento de importantes fatores envolvidos na virulência. A influência dos sistemas de transporte do tipo ABC (*ATP-Binding Cassete*) na virulência bacteriana suporta o uso de componentes desses sistemas como alvos promissores em estratégias vacinais. Em *S. mutans* a proteína ligadora de fosfato inorgânico (PstS) exerce influência na expressão de fatores associados à virulência. Assim, a proposta deste trabalho foi a caracterização imunológica de uma nova estratégia vacinal de mucosa anti-cárie baseada na proteína PstS de *S. mutans* como antígeno alvo. Inicialmente, a forma recombinante da proteína PstS foi obtida no estado solúvel em *Escherichia coli*. A caracterização biofísica da proteína rPstS purificada revelou uma estrutura secundária estável e semelhante a de outras proteínas ligadoras, além da capacidade de interação com seu ligante. Epítomos antigênicos conservados, conformacionais e lineares, foram identificados na proteína recombinante pela reatividade com soro gerado contra células intactas de *S. mutans*. Foi possível determinar a imunogenicidade da proteína rPstS quando administrada por via sublingual, combinada ou não a um adjuvante derivado da toxina termo-lábil (LTK4R) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Respostas humorais, sérica e de mucosa, foram estimuladas pela vacina e anticorpos rPstS-específicos interferiram na colonização oral *in vivo* por *S. mutans* em modelo murino. Em conjunto, os resultados obtidos indicam que a proteína rPstS preserva características estruturais e imunológicas da proteína nativa que podem ser exploradas em estratégias vacinais para o controle da cárie dental.

**Palavras-chave:** *Streptococcus mutans*. Cárie dental. Vacinas. PstS. Vacinas de mucosa. Imunização sublingual.

## ABSTRACT

FERREIRA, E. L. **Development of a new vaccine strategy against human dental caries based on the PstS protein of *Streptococcus mutans***. 2015. 63 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

*Streptococcus mutans* is the main etiological agent of human dental caries, an infectious disease worldwide distributed, for which there is no vaccine available despite the knowledge of important virulence-associated factors. The influence of ABC (ATP-Binding Cassete) transport systems in bacterial virulence supports the use of components of these systems as promising targets in vaccine approaches. In *S. mutans* the phosphate binding protein (PstS) influences the expression of virulence-associated traits. Thus, the main purpose of this work was the immunological characterization of a new anti-caries mucosal vaccine approach based on the PstS of *S. mutans* as target antigen. First, a recombinant soluble PstS form was obtained in *Escherichia coli*. The biophysical characterization of the purified rPstS protein showed a stable secondary structure, similar to other binding proteins, and retained ability to interact with its ligand. Conserved antigenic epitopes, including conformational and linear epitopes, were identified in the recombinant protein by reactivity with serum raised against intact *S. mutans* cells. The immunogenicity of the rPstS protein was determined after administration via the sublingual route in combination with an adjuvant derived from the heat-labile toxin (LTK4R) of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Mucosal and systemic antibody responses were stimulated by this vaccine and the rPstS-specific antibodies interfered with *S. mutans* oral colonization *in vivo* in a murine model. Taken together, the results indicated that the recombinant PstS protein preserves structural and immunological characteristics of the native protein that can be exploited in vaccine strategies for the control of dental caries.

**Key words:** *Streptococcus mutans*. Dental caries. Vaccines. PstS. Mucosal vaccines. Sublingual immunization.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Organização típica de transportadores ABC em bactérias Gram-negativas.....	21
Figura 2. Componentes do sistema Pst de transporte de fosfato inorgânico em Gram-positivos.....	23
Figura 3. Protocolo vacinal de mucosa.....	35
Figura 4. Construção do plasmídeo pGEM <sub>pstS</sub> . ....	39
Figura 5. Construção do plasmídeo pET <sub>pstS</sub> . ....	40
Figura 6. Expressão da proteína rPstS na linhagem <i>E. coli</i> BL 21 (DE3) Star pLysS.. ....	41
Figura 7. Purificação da proteína rPstS por cromatografia de afinidade ao níquel.....	43
Figura 8. Caracterização estrutural da proteína PstS recombinante. ....	45
Figura 9. Avaliação da antigenicidade da proteína rPstS.....	47
Figura 10. Resposta imune humoral PstS-específica .....	48
Figura 11. Células secretoras de anticorpos IgA PstS-específicas .....	49
Figura 12. Perfil de secreção de citocinas.. ....	50
Figura 13. Soro-neutralização <i>in vivo</i> da adesão de <i>S. mutans</i> à cavidade oral de camundongos.....	51
Figura 14. Inibição da colonização oral de camundongos por <i>S. mutans</i> .....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequências dos iniciadores desenhados para a amplificação do gene <i>pstS</i> . As enzimas de restrição e seus respectivos sítios foram destacados em negrito. ....	26
Tabela 2– Vetores utilizados e construídos neste trabalho.....	28
Tabela 3 – Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.....	29
Tabela 4 - Características das linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> utilizadas nos testes de expressão da proteína PstS. ....	30
Tabela 5 - Conteúdo da estrutura secundária da proteína PstS recombinante de <i>S. mutans</i> .....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

‰: porcentagem

°C: graus celsius

ABC: *ATP Binding Cassete* (Cassete de ligação ao ATP)

ATP: trifosfato de adenosina

CBA: cytometric beads assay

CD: *circular dichroism* (dicroísmo circular)

CSA: célula secretora de anticorpo

CT: *cholera toxin* (toxina colérica)

DNA: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxorribonucléico)

DO: densidade ótica

ELISA: *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)

ELISOT: modificação do ELISA para detecção de células secretoras de anticorpo

GBPs: proteínas ligadoras de glucanos

gp340: Glicoproteína 340

Gtfs: glicosiltransferases

IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$

IgA: imunoglobulina A

IgG: imunoglobulina G

IgG1: subclasse 1 da imunoglobulina G

IgG2a: subclasse 2a da imunoglobulina G

IL-6: interleucina 6

IPTG: *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

kDa: quilodalton

kg: quilograma

L: litro

LB: Meio Luria-Bertani

LCN: linfonodo cervical

LTK4R: mutante de LT com substituição de uma lisina por uma arginina na posição 4 da subunidade A.

M: molar

mg: miligrama

ml: mililitro

mM: milimolar

m/v: razão massa/volume

ng: nanograma

nm: nanômetro

OPD: *o*-Phenylenediamine

OppA: proteína ligadora de oligopeptídeos

OVA: ovoalbumina

PAGE: *polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese em gel de poliacrilamida)

pb: pares de bases

PBS: *phosphatase buffered saline* (tampão salina fosfato)

PCR: *polymerase chain reaction* (reação de polimerase em cadeia)

PEC: polissacarídeo extracelular

pH: potencial hidrogeniônico

PiaA: componente ligador do transportador 2 de ferro de pneumococo

Pi: fosfato inorgânico

PiuA: componente ligador do transportador 1 de ferro de pneumococo

pmol: picomol

PMSF: *phenylmethanesulfonylfluoride*

psi: unidade de pressão no sistema inglês/americano

Pst: *Phosphate Specific Transport* (Transporte Específico de Fosfato)

PstS: proteína ligadora de fosfato

RNA: *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)

rpm: rotações por minuto

rPstS: proteína PstS recombinante

SDS: sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

S-IgA: IgA secretada

Th: *T helper*

TTFC: *tetanus toxin C fragment* (fragmento C da toxina tetânica)

UFC: unidade formadora de colônia

v/v: razão volume/volume

X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolil-b-D-galactopiranosídeo

μL: microlitro

μg: micrograma

μm: micrômetro

μM: micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 <i>Streptococcus mutans</i> e a cárie dental .....	17
1.2 Antígenos vacinais contra a cárie.....	19
1.3 Transportadores ABC como antígenos vacinais.....	20
1.4 A proteína PstS como antígeno vacinal .....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1 Objetivo geral.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 Amplificação, clonagem e subclonagem do gene <i>pstS</i> .....	26
3.2 Expressão da proteína PstS recombinante.....	28
3.2.1 Teste de expressão em diferentes linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> .....	28
3.2.2 Fracionamento da cultura induzida de BL21 (DE3) Star <i>pLysS</i> .....	30
3.2.3 Imunodeteção da proteína rPstS .....	31
3.3 Purificação da proteína rPstS por cromatografia de afinidade .....	31
3.4 Análises estruturais da proteína rPstS .....	32
3.5 Determinação da antigenicidade da proteína rPstS por imunodeteção.....	33
3.5.1 ELISA.....	33
3.5.2 Dot Blot .....	33
3.6 Regime vacinal empregado .....	34
3.7 Avaliação da resposta imune PstS-específica.....	35

3.7.1	<i>Quantificação dos anticorpos PstS-específicos gerados após protocolo vacinal de mucosa</i>	35
3.7.2	<i>Determinação de células secretoras de anticorpos (CSA) IgA</i>	36
3.7.3	<i>Dosagem de citocinas</i>	36
3.8	<b>Análise da funcionalidade dos anticorpos PstS-específicos</b>	37
3.8.1	<i>Ensaio de soro-neutralização in vivo</i>	37
3.8.2	<i>Ensaio desafio in vivo</i>	38
4	<b>RESULTADOS</b>	39
4.1	<b>Clonagem e subclonagem do gene <i>pstS</i></b>	39
4.2	<b>Expressão e purificação da proteína PstS recombinante</b>	40
4.3	<b>Características estruturais da proteína rPstS</b>	43
4.4	<b>Avaliação da antigenicidade da proteína rPstS</b>	46
4.5	<b>Imunogenicidade da proteína rPstS em após administração pela via sublingual</b>	47
4.6	<b>Funcionalidade <i>in vivo</i> dos anticorpos rPstS-específicos</b>	50
5	<b>DISCUSSÃO</b>	53
6	<b>CONCLUSÕES</b>	59
	<b>REFERÊNCIAS</b>	60

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Streptococcus mutans* e a cárie dental

O gênero *Streptococcus* compreende espécies bacterianas Gram-positivas, catalase-negativas, arrançadas em cadeia e relacionadas a diferentes processos infecciosos em humanos. A espécie *Streptococcus mutans* é imóvel, anaeróbia facultativa e capnofílica, possui a capacidade de metabolizar diferentes carboidratos e sintetizar glucanos aderentes solúveis em água, o que lhe confere ainda a habilidade de aderir a superfícies lisas. Dentro do gênero, esta espécie está enquadrada no grupo Mutans, que compreende outras bactérias colonizadoras da cavidade oral de mamíferos, sendo frequentemente designadas como grupo viridans, pelo padrão de  $\alpha$ -hemólise das colônias em ágar sangue. Além disso, *S. mutans* é o principal agente infeccioso relacionado ao desenvolvimento da cárie dental na espécie humana e também é associada a casos de endocardite bacteriana (BANAS, 2004; NOBBS et al., 2009).

A cárie dental é o resultado da dissolução localizada do tecido calcificado do dente pela produção de ácidos por bactérias presentes no biofilme dental. É uma das doenças mais comuns em humanos e tem atingido proporções epidêmicas em países desenvolvidos e subdesenvolvidos. O estabelecimento da cárie depende da influência de múltiplos fatores, como a susceptibilidade e dieta rica em açúcar do hospedeiro, além de uma microbiota cariogênica capaz de produzir ácidos a partir dos carboidratos da dieta, todos esses fatores associados ao tempo (SHIVAKUMAR et al., 2008). Diferentes microrganismos estão presentes na placa dental e são identificados em lesões cariogênicas, no entanto *S. mutans* é a espécie mais prevalente e mais cariogênica, devido ao seu papel na biossíntese da matriz do biofilme dental e pela sua capacidade de sobreviver frente a outras espécies em condições de baixo pH (LEMOS et al., 2013; SHIVAKUMAR et al., 2008).

Estudos acerca da biologia de *S. mutans* demonstraram a presença de fatores de virulência relacionados à patogenicidade da carie dental, como (i) a habilidade de adesão/produção de biofilme na superfície dental, (ii) a capacidade de produção de ácidos (acidogenicidade) a partir de componentes da dieta do hospedeiro e (iii) resistência ao pH ácido (aciduricidade) (HAMADA et al., 1984; MICHALEK et al., 1981). Essas características

contribuem para o aumento da proporção de *S. mutans* no biofilme dental, o que leva a uma acentuada queda no pH e aumenta a probabilidade de desmineralização do esmalte dental (BANAS, 2004).

O processo de adesão e formação de biofilme é essencial para o desenvolvimento da carie dental, uma vez que permite o contato inicial da bactéria e seus produtos metabólicos à superfície do dente (HAMANDA et al., 1980). Esse processo envolve duas etapas: o primeiro estágio, sacarose-independente, mediado pela adesina bacteriana antígeno I/II (ou proteína SpaP, ou proteína P1) que interage com as proteínas salivares da película adquirida, mais precisamente a gp340, que recobre o esmalte do dente, garantindo o início do processo de fixação. No segundo estágio, sacarose-dependente, há a produção de glucanos insolúveis, denominados polissacarídeos extracelulares (PECs), produzidos pelas glicosiltransferases (Gtf) a partir da sacarose proveniente da dieta do hospedeiro. Essas estruturas interagem com as próprias Gtfs e adesinas ligadoras de glucano (GBPs), presentes na superfície da célula de *S. mutans*, estabelecendo a colonização da superfície dental (BANAS, 2004; HAMANDA et al., 1984; RUSSELL, 2006).

Além disso, *S. mutans* possui vias glicolíticas completas para produção de ácidos a partir de carboidratos e a velocidade com que produz esses ácidos supera a de outros estreptococos orais. Isto conduz a uma mudança na composição microbiana da placa dental, aumentando a proporção desta bactéria e de outras espécies acidogênicas e ácido tolerantes, o que por sua vez mantém o pH da placa baixo, favorecendo assim a desmineralização do esmalte dental. Somado a essa acidogenicidade, o *S. mutans* ainda consegue manter seu metabolismo nos baixos níveis de pH da placa dental e essa aciduricidade também é notavelmente distinta de outras espécies do gênero (BANAS, 2004).

A forma tradicional de lidar com a cárie é feita pela remoção da estrutura dental comprometida. Ao longo dos anos, medidas preventivas também foram adotadas, como uso de fluoreto na água, produtos com menor teor de açúcar, selantes e aumento do acesso à saúde bucal, com impacto positivo na redução no número de casos. No entanto, nos locais em que não se usa água fluoretada ou em que a população não tem acesso à saúde bucal, outras medidas preventivas se fazem necessárias, como a imunização da população através de vacinas, uma estratégia clássica na prevenção de doenças infecciosas (BANAS, 2004; SHIVAKUMAR et al., 2009).

## 1.2 Antígenos vacinais contra a cárie

O conceito de imunização contra a cárie existe desde o momento em que se determinou que esta doença era o resultado da colonização do dente por bactérias acidogênicas. Tendo sido reconhecido que estreptococos do grupo mutans, especialmente *S. mutans*, eram os principais responsáveis pelo desencadeamento desta doença, este passou a ser o alvo das abordagens vacinais (RUSSELL et al., 2004; SMITH, 2010). A patogênese molecular de *S. mutans* no desenvolvimento da cárie envolve várias etapas que são passíveis de intervenção imune. A bactéria pode ser eliminada da cavidade oral ainda na fase salivar, por agregação mediada por anticorpos, estes ainda podem bloquear receptores necessários para colonização ou agregação, e ainda inativar enzimas responsáveis pela síntese do biofilme (SMITH, 2003).

Acredita-se que a resposta imune específica contra este patógeno seja dependente de anticorpos salivares, cujo principal é a imunoglobulina A na forma secretada (S-IgA), produto do sistema imune de mucosa, assim como da presença de IgG sistêmico presente no fluido crevicular. Os mecanismos de ação mediados por S-IgA, que ocorrem em outros sítios de mucosa, também podem ocorrer na cavidade oral, permitindo o bloqueio de adesinas e neutralização de fatores de virulência. Da mesma forma os anticorpos IgG plasmáticos disponíveis no fluido cervical gengival poderiam contribuir com os mecanismos protetores contra *S. mutans* (RUSSELL et al., 1999; SHIVAKUMAR et al., 2009).

Algumas proteínas de superfície ou secretadas de *S. mutans* que participam da adesão ao dente e da produção e ligação ao glucano do biofilme dental foram propostas como possíveis antígenos vacinais. A adesina conhecida como Ag I/II ou P1, contém domínios de ligação à saliva em sua estrutura associados à capacidade de adesão ao dente. Anticorpos direcionados contra a proteína inteira ou específicos para o domínio de ligação à saliva foram capazes de interferir com a adesão de *S. mutans*, bloqueando as etapas iniciais de colonização no biofilme dental (SMITH, 2003, 2010).

As glucosiltransferases (GTFs) produzem glucanos solúveis e insolúveis em água, ambos contribuem para a segunda etapa de adesão de *S. mutans*, a sacarose-dependente, e para a cárie (BANAS, 2004). O crescimento de *S. mutans* em presença de anticorpos contra as Gtfs foi capaz de diminuir significativamente a quantidade de biofilme e estudos de imunização utilizando Gtfs como antígeno foram capazes de proteger os animais infectados

com *S. mutans*, provavelmente pela interferência com as atividades funcionais destas enzimas na síntese de glucanos (SMITH, 2003). As proteínas ligadoras de glucano (Gbps) na superfície de *S. mutans* atuam como receptores para a agregação mediada por glucano, também no segundo estágio de adesão ao dente. Entre as quatro diferentes proteínas com atividade ligadora de glucano secretadas por *S. mutans* (GbpA, GbpB, GbpC e GbpD), apenas para GbpB se observou indução de resposta imune e eficácia em ensaios pré-clínicos com uma estratégia vacinal de subunidade (SMITH, 2004).

Em modelos animais esses antígenos foram capazes de induzir produção de IgA salivar e IgG sérica responsáveis pela inibição da formação de cárie e indução de imunidade protetora (RUSSELL et al., 1999, 2004; SMITH, 2010). Apesar da quantidade de evidências experimentais sobre a eficácia de estratégias vacinais contra a cárie dental, não existe nenhuma para uso em humanos. Melhorias nas abordagens vacinais, tem conduzido as pesquisas para a identificação de novos antígenos e adjuvantes de mucosa visando o desenvolvimento de vacinas anti-cárie eficazes (SMITH, 2003, 2010).

### 1.3 Transportadores ABC como antígenos vacinais

Sistemas de transporte são essenciais para a passagem de substâncias através do envoltório bacteriano, como os nutrientes necessários ao crescimento celular. Entre os sistemas de transporte dependentes de energia, destacam-se aqueles que dependem da hidrólise do ATP, como os transportadores do tipo ABC (*ATP Binding Cassete*). Esses sistemas estão presentes nos três grandes reinos biológicos (*Archea*, *Bacteria* e *Eukarya*) e são utilizados tanto para captar, como para exportar diferentes substâncias (HIGGINS, 1992, 2001). Os sistemas importadores do tipo ABC são restritos às bactérias e archeas, sendo responsáveis pela captação de nutrientes como fosfato, oligopeptídeos, poliaminas, açúcares, nitrato, sulfato, ferro, molibdato e outros (LINTON et al., 1998).

Os sistemas do tipo ABC, em geral, representam 5% dos genomas bacterianos conhecidos e são constituídos por três componentes funcionais e estruturais (figura 1). Dois componentes apresentam-se associados à membrana citoplasmática, um formando um poro transmembrânico por onde a substância é transportada e o outro, associado à face interna da membrana, responsável por se ligar e hidrolisar o ATP, fornecendo a energia necessária para

o transporte (MOUTRAN et al., 2003). O terceiro componente mostra-se solúvel e retido no periplasma nas bactérias gram-negativas ou associado à membrana citoplasmática nas bactérias gram-positivas e, portanto, exposto na superfície bacteriana. Esse componente tem como principal função o reconhecimento e a ligação ao substrato sendo responsável pela especificidade e pela afinidade do sistema a um determinado ligante (DASSA, 2000).

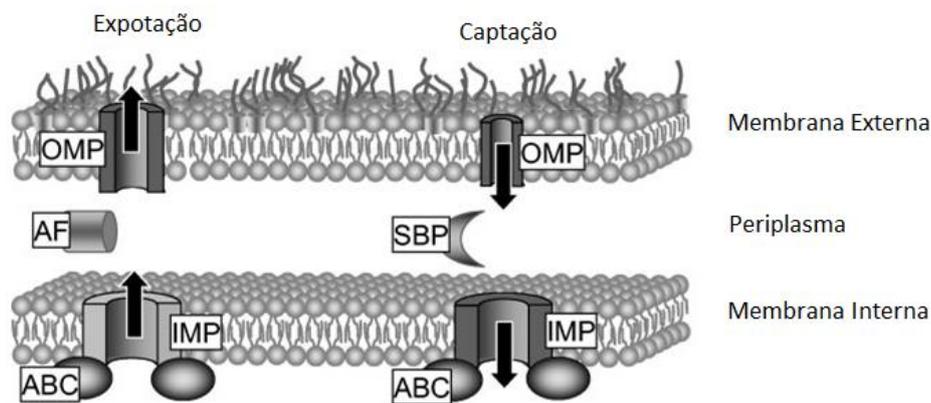


Figura 1. Organização típica de transportadores ABC em bactérias Gram-negativas. Os componentes IMP (Componente de membrana interna) e ABC (Cassete de ligação ao ATP) estão presentes nos dois tipos de sistema. Nos sistemas de captação a proteína ligadora (SBP) se liga especificamente à molécula que será internalizada. Em alguns sistemas de exportação existe um fator acessório (AF) que facilita a saída da molécula. As proteínas de membrana externa (OMP) auxiliam a entrada e saída de moléculas transportadas. Fonte: Adaptado de Garmory e Titball (2004).

Além do papel relacionado ao transporte de substâncias, os transportadores ABC também são capazes de influenciar direta ou indiretamente a expressão de fatores associados à virulência em espécies patogênicas ao homem. Em *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis* e *Staphylococcus aureus* foi possível relacionar a ausência de determinados transportadores ABC de captação de nutrientes com atenuação da virulência. Da mesma forma, transportadores de ferro e manganês mostraram-se essenciais para a virulência de *Yersinia pestis* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (GARMORY; TITBALL, 2004).

Devido ao importante papel na fisiologia e virulência bacteriana, os transportadores ABC vêm sendo investigados como possíveis alvos vacinais. Diferentes componentes de sistemas ABC, sobretudo os componentes ligadores de substrato, revelaram ter elevada

antigenicidade, indicando um possível papel desses transportadores como alvo para imunoterapia (GARMORY; TITBALL, 2004).

Algumas abordagens vacinais utilizando componentes de sistemas de transporte ABC foram testadas em modelos animais. Destacam-se o uso da proteína PstS de *Mycobacterium tuberculosis*, relacionada com o transporte de fosfato, das proteínas PiuA e PiaA de *S.pneumoniae*, envolvidas na captação de ferro e da proteína OppA de *Y. pestis* e *Moraxella catarrhalis* capazes de transportar uma variedade de peptídeos (BROWN et al., 2001; TANABE et al., 2006; TANGHE et al., 1999; YANG et al., 2011). Esses estudos demonstram que, além de imunogênicas, essas proteínas podem promover proteção vacinal em modelos experimentais de infecção.

Em *S. mutans* cerca de 10% do genoma é dedicado à codificação de transportadores ABC (AJDÍC et al., 2002). Estudos relacionados a esses transportadores nesta espécie são limitados e restringem-se a sistemas envolvidos na captação de polissacarídeos, maltose e ferro. Pesquisas recentes descreveram as características dos sistemas de captação de oligopeptídeos (NEPOMUCENO et al., 2007), glutamato (KRASSEL et al., 2010) e fosfato inorgânico, ou Pst, em *S. mutans* (LUZ et al., 2012).

#### **1.4 A proteína PstS como antígeno vacinal**

O sistema Pst possui papel importante na captação de fosfato inorgânico (Pi) necessário na biossíntese de ácidos nucleicos, fosfolipídeos e outros componentes celulares (VAN VEEN, 1997). Esse sistema é responsável pela captação de Pi em situações de carência de fosfato extracelular e em *S. mutans* UA159 é codificado pelo operon policistrônico *pst*, constituído de cinco genes estruturais (*pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* e *smu.1134*). O gene *pstS* codifica a proteína ligadora de Pi que confere afinidade ao sistema, os genes *pstC* e *pstA* codificam os dois polipeptídeos que formam o canal transmembrânico e os genes *pstB* e *smu.1134* codificam o componente de ligação e hidrólise do ATP (figura 2).

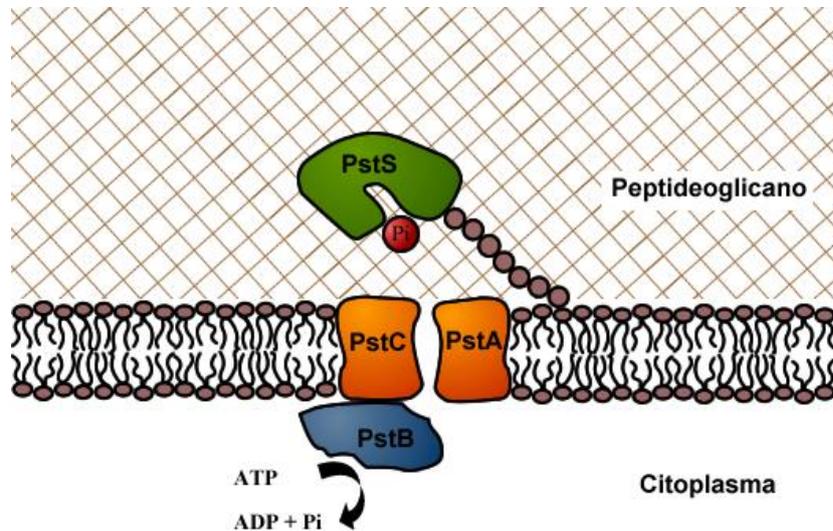


Figura 2. Componentes do sistema Pst de transporte de fosfato inorgânico em Gram-positivos. A proteína PstS é o componente ligador do sistema que interage especificamente com o fosfato inorgânico. Os componentes PstC e PstA constituem o canal transmembrânico pelo qual o fosfato será transportado para dentro da célula. O componente citoplasmático PstB é responsável por se ligar e hidrolisar ATP fornecendo energia para que o transporte ocorra. Fonte: Adaptado de Dassa, 2000.

Além da função relacionada à captação de fosfato inorgânico em condições de carência deste nutriente, o sistema Pst também está relacionado a mecanismos de virulência em diferentes patógenos bacterianos (LAMARCHE et al., 2008). Em *S. pneumoniae* a mutação do gene *pstB*, além de diminuir a captação de fosfato, levou a redução da frequência de transformação e patogenicidade em modelo murino de septicemia (NOVAK et al., 1999; POLISSI et al., 1998). No caso em que o gene *pstS* foi inativado, houve aumento da susceptibilidade à penicilina em relação a linhagem selvagem (SOUALHINE et al., 2005).

A caracterização do sistema *pst* em *S. mutans* confirmou sua funcionalidade na linhagem UA159 e mostrou o papel do componente ligador deste sistema. Através da deleção do gene *pstS*, bloqueando a síntese da proteína ligadora de fosfato PstS, observou-se uma diminuição da taxa de crescimento em meios com concentrações baixas ou intermediárias de fosfato, condição em que o sistema Pst deveria atuar ativamente na captação deste íon. Isto porque a ausência do componente ligador do sistema reduziu em praticamente a metade a captação de Pi extracelular, interferindo no metabolismo bacteriano. Além disso, a ausência

da proteína PstS promoveu a redução da capacidade de adesão à superfícies abióticas cobertas com saliva e produção *in vitro* do polissacarídeo extracelular (PEC), fatores necessários para adesão à superfície dental (LUZ et al., 2012).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar as propriedades antigênicas e imunogênicas da proteína ligadora de fosfato (PstS), do sistema de captação de fosfato inorgânico de *S. mutans*, a fim de determinar seu papel enquanto antígeno vacinal.

### 2.2 Objetivos específicos

I. Obter uma forma recombinante da proteína PstS de *S. mutans* a partir de sistema procarioto.

II. Avaliar as propriedades estruturais e antigênicas da PstS recombinante.

III. Determinar sua imunogenicidade em uma estratégia vacinal de mucosa pela via sublingual, através da análise das respostas imunológicas induzidas.

IV. Verificar a funcionalidade dos anticorpos gerados após o protocolo vacinal frente à colonização oral *in vivo* por *S. mutans*.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amplificação, clonagem e subclonagem do gene *pstS*

O gene *pstS* foi amplificado a partir do DNA genômico da linhagem UA159 de *S. mutans*, obtido previamente segundo adaptações do protocolo descrito por Burne *et al.* (1987), através de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os iniciadores específicos desenhados (tabela 1). As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo aproximadamente 50 ng de DNA, 10 pmoles de cada um dos iniciadores, 25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dideoxynucleotídeos trifosfatados, 2 unidades da enzima Taq DNA Polimerase (recombinante) e seu respectivo tampão na concentração final de 1x Fermentas<sup>®</sup>. O programa de PCR utilizado envolveu um passo de desnaturação a 96 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 2 minutos a 96 °C, 1 minuto a 58 °C e 2 minutos a 72 °C, com um passo final de extensão de 20 minutos a 72 °C.

Tabela 1- Sequências dos iniciadores desenhados para a amplificação do gene *pstS*. As enzimas de restrição e seus respectivos sítios foram destacados em negrito.

Oligonucleotídeo	Sequencia
FwpstS <b>Bam</b> HI	5'CCATT <b>GGATC</b> CATTGATAAAGGGCAGTCAATTAC3'
RvpstS <b>Xho</b> I	5'GCAACT <b>CGAGT</b> ACTTAGCAATTACAGTGCCATC3'

Após a amplificação, o fragmento do gene *pstS* foi clonado no vetor pGEM T-easy Promega<sup>®</sup> (Promega, Madison, Estados Unidos), através de reação de ligação na razão molar inserto/vetor 3:1, conforme instruções do fabricante. A mistura de ligação foi utilizada na transformação de células DH5α quimiocompetentes (*E. coli* K12), pelo método de transformação química descrito por Sambrook e Russel (2001). O transformante recombinante foi selecionado a partir da resistência à ampicilina e incapacidade de degradação do X-gal,

em seguida o DNA plasmidial foi extraído através de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e submetido a tratamento com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Xho*I (Fermentas), de acordo com as orientações do fabricante, para confirmação da clonagem do fragmento de interesse. O perfil de restrição foi visualizado em gel de agarose 0,8% (m/v) e a construção resultante foi denominada pGEM*pst*S (tabela 2).

Para a etapa de subclonagem do gene *pst*S no vetor de expressão pET28a, inicialmente a construção pGEM*pst*S e o vetor pET28a vazio foram tratadas com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Xho*I, através de dupla digestão conforme instruções do fabricante. A amostra do pGEM*pst*S digerida foi separada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) e o fragmento liberado correspondente ao gene *pst*S, de aproximadamente 800 pb, foi excisado do gel e purificado utilizando-se o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE, healthcare). O inserto purificado foi então clonado no vetor pET28a digerido através de reação de ligação realizada na razão molar inserto/vetor de 3:1, seguindo as instruções do fabricante para o uso da T4 DNA ligase (Fermentas). A mistura de ligação foi transformada em *E. coli* DH5a quimiocompetente e o transformante recombinante selecionado a partir da resistência à canamicina, e posteriormente submetido à extração do DNA plasmidial. A construção foi confirmada através de análise de restrição, utilizando as enzimas já citadas, seguida da visualização em gel de agarose 0,8% (m/v), e por sequenciamento, sendo denominada pET*pst*S (tabela 2).

Tabela 2– Vetores utilizados e construídos neste trabalho.

<b>Vetor</b>	<b>Característica</b>	<b>Referência</b>
pGEM T-easy	Vetor de clonagem linear de <i>E. coli</i> , cauda poliT (T-end), Amp <sup>r</sup> , operon lac.	Promega™
pET28a	Vetor de expressão em <i>E. coli</i> , <i>Histag</i> N-terminal, Km <sup>r</sup> .	Novagen
pGEM <sub>pstS</sub>	Vetor pGEM T-easy contendo a sequência do gene <i>pstS</i> de <i>S. mutans</i> UA 159.	Este trabalho
pET <sub>pstS</sub>	Vetor pET28a contendo a sequência do gene <i>pstS</i> de <i>S. mutans</i> UA 159.	Este Trabalho

### 3.2 Expressão da proteína PstS recombinante

#### 3.2.1 Teste de expressão em diferentes linhagens recombinantes de *E. coli*

Os ensaios de expressão *in vitro* da proteína PstS recombinante foram realizados nas linhagens de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (DE3) RIL, BL21 (DE3) RP, BL21 (DE3) pLysS e BL21 (DE3) Star pLysS (tabela 3 e 4). Após transformação química com o vetor pET<sub>pstS</sub>, as bactérias foram crescidas por uma noite em meio LB suplementado com canamicina (50 µg/ml). Em seguida, foi realizado o inóculo das linhagens recombinantes (1:100) em 50 ml de meio LB, contendo 50 µg/ml de canamicina, e estes foram mantidos a 37 °C sob agitação (200 rpm) até a fase de crescimento exponencial (DO<sub>600nm</sub> 0,5 – 0,8), quando se acrescentou à cultura o indutor IPTG na concentração final de 1 mM. Foram retiradas amostras de 1 ml das culturas para análise da expressão antes da adição de IPTG (cultura não induzida, T<sub>0</sub>) e após quatro horas de incubação (culturas induzidas, T<sub>4</sub>). As amostras coletadas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, o precipitado foi ressuspensão em tampão de amostra para

eletroforese em gel de poliacrilamida (200 mM Tris-HCL pH 6,8; 8% SDS (m/v); Glicerol 40% (v/v), azul de bromofenol 0,4% (m/v); 200 mM 2-β-mercaptoetanol) e aquecido a 100 °C por 10 minutos. Quantidades semelhantes de células foram aplicadas por poço e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%). Após o término da corrida o gel foi corado com Comassie Blue conforme descrito por Sambrook e Russell (2001).

Tabela 3 – Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

<b>Linhagem</b>	<b>Característica</b>	<b>Referência</b>
<i>E. coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ <sup>-</sup>	Invitrogen <sup>TM</sup>
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3).	Invitrogen <sup>TM</sup>
BL21 (DE3) RIL	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [ <i>argU ileY leuW Cam</i> <sup>r</sup> ]	Stratagene <sup>TM</sup>
BL21 (DE3) RP	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [ <i>argU ptoL Cam</i> <sup>r</sup> ]	Stratagene <sup>TM</sup>
BL21 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> ).	Invitrogen <sup>TM</sup>
BL21 (DE3) Star pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm me131</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>R</sup> ).	Invitrogen <sup>TM</sup>
BLPstS	Linhagem de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Star pLysS transformada com o vetor pETpstS.	Este trabalho
<i>S. mutans</i> UA159	Linhagem selvagem do sorotipo c; genoma sequenciado.	AJDIC <i>et al.</i> , 2002
<i>S. mutans</i> NG8	Linhagem selvagem do sorotipo c, Erm <sup>S</sup> , Spec <sup>S</sup> , Kan <sup>S</sup> .	LI <i>et al.</i> , 2001

Tabela 4 - Características das linhagens recombinantes de *E. coli* utilizadas nos testes de expressão da proteína PstS.

<b>Linhagem</b>	<b>Resistência</b>	<b>Características</b>	<b>Vantagens</b>
BL21(DE3) (Invitrogen)	--	Contem o $\lambda$ DE3 carreando o gene da T7 RNA polimerase (induzido por IPTG). Deficiente nas proteases <i>lon</i> e <i>OmpT</i> .	Hospedeira comum para expressão em altos níveis de proteínas heterólogas não tóxicas.
BL21(DE3) RIL (Stratagene)	Cloranfenicol	Contem cópias extras dos genes <i>argU</i> , <i>ileX</i> e <i>leuW</i> .	Expressa tRNAs que reconhecem códons raros: AGA e AGG (arginina); AUA (isoleucina) e CUA (leucina).
BL21(DE3) RP (Stratagene)	Cloranfenicol	Contem cópias extras dos genes <i>agrU</i> e <i>proL</i> .	Expressa tRNAs que reconhecem códons raros: AGA e AGG (arginina) e CCC (prolina).
BL21(DE3) pLysS (Invitrogen)	Cloranfenicol	Contem o plasmídeo pLysS ( $Cm^r$ ) produtor da lisozima T7.	Redução dos níveis basais de expressão do gene de interesse. Maior controle na expressão de proteínas tóxicas.
BL21(DE3) Star pLysS (Invitrogen)	Cloranfenicol	Possui o gene <i>rne</i> mutado ( <i>rne131</i> ) que codifica uma RNaseE truncada sem atividade endonucleolítica.	Maior estabilidade do mRNA e maior rendimento da proteína recombinante.

### 3.2.2 Fracionamento da cultura induzida de BL21 (DE3) Star pLysS

No extrato bacteriano induzido ( $T_4$ ) em que se identificou uma banda superexpressa, com massa molecular correspondente à proteína PstS recombinante (32,7 kDa), o precipitado induzido foi ressuscitado em 1/10 do volume inicial da cultura em tampão Tris-HCL (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,2) e lisozima (800  $\mu$ g/ml), seguido de incubação em gelo por 30 minutos. Após esse período foi adicionado 0.01% SDS e 0.01 mM PMSF (fenilmetanosulfonilfluorido), e as suspensões foram sonicadas por 2.5 minutos, com pulso

ativo de 30 segundos e pausa de 1 minuto, com amplitude mínima de 40% por 3 vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.000 rpm e a 4 °C, então o sobrenadante da cultura, correspondente à fração solúvel foi separado.

### **3.2.3 Imunodetecção da proteína rPstS**

A confirmação da expressão da proteína rPstS foi realizada através de *Western Blot* (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Amostras correspondentes ao extrato não induzido (T<sub>0</sub>), induzido após adição de IPTG (T<sub>4</sub>) e à fração solúvel do extrato induzido, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% seguido de transferência para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada com solução de PBS 1x contendo 0,3% de Tween-20 (PSBT 0,3%) por 18 horas a 4 °C e lavada três vezes com PBS 1x contendo 0,05% de Tween-20 (PBST). Após as lavagens a membrana foi incubada com anticorpos monoclonais específicos contra a cauda de histidina (anti-HisTag) diluídos 1:3000 em solução de PSBT 0,3%, por uma hora. Depois de um novo ciclo de lavagem a membrana foi incubada com o segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PSBT 0,3%, por mais uma hora seguido de um último ciclo de lavagem. Ao final, As reações foram reveladas utilizando o kit quimioluminescente (Super Signal™, Pierce), conforme descrito pelo fabricante, em fotodocumentador ChemiDoc™ MP (Bio-Rad).

### **3.3 Purificação da proteína rPstS por cromatografia de afinidade**

A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS albergando o plasmídeo pET<sub>pstS</sub> (BLPstS) foi cultivada em 1 L de meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina a 37 °C até uma densidade óptica de 0,5-0,8 a 600 nm. O IPTG foi adicionado para uma concentração final de 1 mM, a cultura foi incubada por mais 4 horas e em seguida centrifugada (10.000 rpm por 20 minutos). As células sedimentadas foram suspensas em tampão A (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,2) e submetidas à lise mecânica (600 psi por 15 minutos) em um homogeneizador modelo APLAB-10 (ARTEPEÇAS, Brasil). Após a centrifugação (10.000

rpm, 30 minutos), o sobrenadante da cultura, correspondente à fração solúvel foi separado e filtrado em filtro de acetato de celulose com poros de até 0,22 µm (Biotech).

Para a purificação da proteína de fusão com a cauda de histidina a amostra da fração solúvel foi submetida à cromatografia de afinidade ao níquel em coluna His Trap HP 5 mL (GE, healthcare). O processo de purificação automatizado foi conduzido em aparelho AKTA – FPLC (Pharmacia), segundo instruções do fabricante. Inicialmente, a coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna do tampão A, num fluxo de 1,0 ml/minuto. Em seguida, o extrato solúvel da linhagem BLPstS foi aplicado na coluna no mesmo fluxo de 1,0 ml/minuto. Por fim, a eluição da proteína foi realizada pelo aumento gradual da concentração de imidazol (de 7 mM a 1 M) presente no tampão B (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 M imidazol, pH 7,2). As frações eluídas foram analisadas em SDS-PAGE 12,5% e as alíquotas contendo a proteína rPstS purificada foram quantificadas através de kits comerciais (Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, Thermo Scientific), sendo posteriormente estocadas a -20 °C até o uso.

### **3.4 Análises estruturais da proteína rPstS**

A proteína rPstS purificada foi submetida à espectroscopia de dicroísmo circular e de fluorescência, para determinação de características da sua estrutura secundária e estabilidade. Os ensaios de Dicroísmo Circular foram realizados em 10 mM TrisHCl, 50 mM NaCl, pH 7,2 numa concentração final de 13 µM de proteína, na presença ou não de 100 µM de fosfato de sódio Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. As varreduras foram conduzidas em espectropolarímetro JASCO 810 entre os comprimentos de onda de 198-260 nm a uma velocidade de 100 nm/seg e os espectros obtidos pela média de 30 medidas cumulativas consecutivas. A estrutura secundária da PstS foi estimada através do servidor *on line* Dicroweb.

A mesma amostra de proteína foi avaliada quanto à estabilidade conformacional frente a variações de temperatura, no comprimento de onda fixo de 222 nm, também em espectropolarímetro JASCO 810. A temperatura foi aumentada de 20 °C-95 °C a 1 °C/min, sendo em seguida realizada a análise do reenovelamento (95 °C-20 °C).

A espectroscopia de fluorescência foi realizada em espectrofluorímetro ISS com 5 µM da proteína no mesmo tampão utilizado no ensaio anterior, também na presença ou ausência

de fosfato. A varredura foi realizada na faixa de comprimento de onda de 310-450 nm, sendo o comprimento de excitação 280 nm.

### **3.5 Determinação da antigenicidade da proteína rPstS por imunodeteção**

A identificação de epítomos antigênicos na proteína rPstS foi realizada através de ensaios de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) e *Dot Blot* usando anticorpos gerados contra a célula inteira da linhagem UA159 de *S. mutans* ( $\alpha$ -SMU) previamente produzido em nosso laboratório (TAVARES et al., 2010).

#### **3.5.1 ELISA**

No ensaio de ELISA utilizando o soro  $\alpha$ -SMU, microplacas de poliestireno Maxisorp (Nunc<sup>®</sup>) foram sensibilizadas por 16 h a 4 °C com a proteína rPstS (200 ng/poço) fervida a 100°C por 10 minutos ou não fervida. As placas foram lavadas três vezes com tampão fosfato-salina (PBS) contendo 0,05% de Tween-20 (PBST) e bloqueadas com 1X PBS contendo 0,3% de Tween-20, durante 1 h a 37 °C. Após novo ciclo de lavagem (3x), o soro  $\alpha$ -SMU foi adicionado aos poços, diluído em série (1:2) iniciando em 1:500, e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora e 30 min. Depois de um novo ciclo de lavagem (3x), o segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA) na diluição (1:3000) foi adicionado aos poços e novamente incubado. Após a lavagem final, as placas foram reveladas com tampão Citrato de sódio (pH 5.8) contendo OPD (*o*-Phenylenediamine), 12% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a reação foi parada após a adição de 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. A absorbância foi mensurada a 492 nm em leitora de placa (LabSystem).

#### **3.5.2 Dot Blot**

Para a imunodeteção por *Dot Blot*, amostras da proteína rPstS purificada, da proteína P1<sub>39-512</sub> (contendo o fragmento de ligação à saliva da proteína P1 de *S. mutans*) (TAVARES et al., 2010) e da proteína termo-lábil LT1 de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), numa concentração de 2 µg e nas formas solúvel e desnaturada por fervura (100 °C por 10 minutos) foram aplicadas diretamente em uma membrana de nitrocelulose. O bloqueio e as incubações foram realizados conforme descrito no item 3.2.3 utilizando uma diluição de 1:500 do soro α-SMU e o 1:3000 do segundo anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma). As reações foram reveladas utilizando o kit quimioluminescente (Super Signal™, Pierce), conforme descrito pelo fabricante, em fotodocumentador ChemiDoc™ MP (Bio-Rad).

### **3.6 Regime vacinal empregado**

Camundongos da linhagem BALB/c fêmeas, entre 6 a 8 semanas de idade, foram imunizados em um regime vacinal de mucosa (figura 3), com intervalo de 14 dias, pela via sublingual por aplicação tópica embaixo da língua após anestesia [quetamina (80 mg/kg de peso do animal) e xilazina (80 mg/kg de peso do animal)]. Cada grupo de animais recebeu 5 µg da proteína rPstS pura ou em combinação com 1 µg de LTK4R, um derivado da toxina termo-lábil produzida por algumas linhagens de ETEC como adjuvante de mucosa (RODRIGUES et al., 2011), ou PBS no caso do grupo controle.

Para o monitoramento da resposta de anticorpos específicos contra a proteína, foram feitas coletas de sangue um dia antes de cada dose e duas semanas após a última dose, através de punção no plexo submandibular dos animais. As amostras de sangue foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, para retrain e separar o soro dos demais constituintes do sangue. Em seguida, incubadas a 4 °C por 30 min, centrifugadas a 5.000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante separado e mantido a -20 °C.

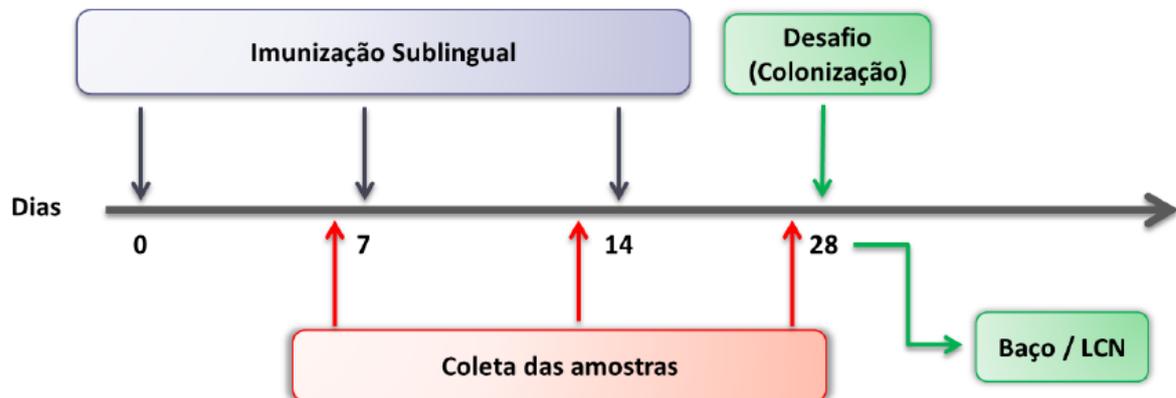


Figura 3. Protocolo vacinal de mucosa. Camundongos BALB/c fêmeas foram submetidos a um protocolo de imunização sublingual de três doses (setas azuis) com a proteína rPstS pura, proteína co-administrada com a LTK4R como adjuvante ou PBS no caso do grupo controle. Amostras de sangue foram coletadas (setas vermelhas) duas semanas após cada dose para obtenção dos soros e avaliação da resposta imune humoral específica. Duas semanas após a última dose, alguns animais foram eutanaziados e tiveram seus baços e linfonodos cervicais (LNC) retirados para dosagem de citocinas e células secretoras de IgA-específica, um outro grupo de animais imunizados foi desafiado frente a colonização oral por *S. mutans*.

### 3.7 Avaliação da resposta imune PstS-específica

#### 3.7.1 Quantificação dos anticorpos PstS-específicos gerados após protocolo vacinal de mucosa

A determinação dos níveis de anticorpos séricos nos animais imunizados foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA), conforme já descrito no item 3.5.1, porém utilizando apenas a proteína rPstS não fervida como antígeno de fase sólida. As amostras de soro de cada grupo imunizado (*pool*) foram adicionadas aos poços, diluídas 1:50 no primeiro poço e 1:2 a partir deste até uma diluição final de 1:3200, e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora e 30 min. Como anticorpos secundários foram utilizados o anticorpo anti-IgG, para a dosagem de IgG total, ou os anticorpos anti-IgG1e anti-IgG2a de camundongo conjugados a peroxidase (Sigma) na diluição (1:3000), para os ELISAs de subclasses. Os valores de absorbância do soro do grupo controle (PBS) foram subtraídos dos valores dos soros vacinais. Curvas de diluição foram feitas para cada amostra, e a concentração de anticorpos antígeno-

específico foi determinada usando uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de anticorpos IgG de camundongo (Southern Biotech®).

### **3.7.2 Determinação de células secretoras de anticorpos (CSA) IgA**

A quantificação das células produtoras de IgA PstS-específica após estímulo *in vitro* foi realizada através de ELISPOT utilizando-se o kit comercial ELISpot<sup>PLUS</sup> for Mouse IgA (MABTECH®). Duas semanas após a última dose vacinal, os animais foram submetidos à eutanásia, tiveram os baços e linfonodos cervinais (LNC) removidos e tratados inicialmente com tampão ACK (BioSourceInternational) para lisar as hemácias. As células foram centrifugadas a 1.200 rpm por 5 minutos, e em seguida tratadas com o tampão de lise, centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI. Foram distribuídas aproximadamente  $10^7$  células/poço em placas de fundo plano, nas quais foram adicionados os estímulos para proliferação policlonal das células B de memória, posteriormente incubadas por 48 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. As placas comerciais de 96 poços foram reativadas conforme instruções do fabricante com Etanol 70%. Após lavagens com água destilada estéril foi adicionado aos poços a proteína rPstS (10 mg/ml), exceto nos controles negativos, e a placa foi incubada a 4 °C por 24 horas.

No dia seguinte, as placas sensibilizadas com o antígeno foram lavadas com PBS estéril e bloqueadas com soro fetal bovino (10%), por 30 minutos a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as células previamente estimuladas foram também lavadas, ressuspensas em meio RPMI, adicionadas aos poços da placa de ELISPOT e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Para a detecção das células produtoras de IgA PstS-específicas, a placa de ELISPOT foi inicialmente lavada com PBS. O anticorpo de detecção (anti-IgA biotilado) foi adicionado aos poços e incubado por duas horas a temperatura ambiente. A placa foi revelada conforme as instruções do fabricante e os *spots* contados com auxílio de uma lupa.

### **3.7.3 Dosagem de citocinas**

O kit comercial BD™CytometricBeadArray Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (CBA) foi utilizado para determinar os níveis de secreção de citocinas no sobrenadante de cultura de células do baço e LNCs dos grupos experimentais. Duas semanas após a imunização, os animais foram submetidos à eutanásia e seus baços e LNCs foram removidos e tratados conforme descrito no item anterior. As células dos linfonodos e os esplenócitos foram cultivadas em uma concentração aproximada de  $10^7$  células/poço por 48 horas a 37 °C em placa de fundo plano em 500 µl de meio RPMI completo, na presença ou não da proteína rPstS na concentração de 10 mg/ml. Após a incubação, o sobrenadante das culturas foi coletado e processado conforme as instruções do kit. As fluorescências foram avaliadas em citometria de fluxo LSRFortessa™ (BD Bioscience) e os níveis de citocinas foram determinados utilizando o BD CBA Software.

### **3.8 Análise da funcionalidade dos anticorpos PstS-específicos**

#### ***3.8.1 Ensaio de soro-neutralização in vivo***

O ensaio de soro neutralização *in vivo* seguiu protocolo descrito por Batista et al. (2014). Resumidamente, camundongos BALB/c fêmeas *naïve*, de 6-8 semanas, receberam um dia antes do ensaio água *ad libitum* contendo 1% de sacarose, como descrito por Ito et al. (2012). Células da linhagem NG8 de *S. mutans* preparadas foram pré-incubadas com o *pool* do soro dos animais imunizados obtidos após a última dose, diluído 1:100 por 30 minutos a 37 °C. Células bacterianas pré-incubadas com soro PBS ou não tratadas foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. Antes da inoculação da bactéria, a cavidade oral dos animais foi tratada com clorexidina (0,12%) e a superfície dental coberta com saliva humana, em seguida as células de *S. mutans* foram inoculadas com o auxílio de micropipeta. Após 6 horas, amostras da cavidade oral foram coletadas com *swab* e plaqueadas em ágar Mitis-Salivarius contendo bacitracina (0,2 U/ml) e sacarose (5 %). As placas foram incubadas a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> por no mínimo 48 horas. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas para determinar o número de células de *S. mutans* recuperadas da cavidade oral dos animais.

### 3.8.2 Ensaio desafio *in vivo*

Após três semanas da última dose, os animais submetidos ao protocolo de imunização sublingual receberam um dia antes do ensaio água *ad libitum* contendo 1% de sacarose, como descrito por Ito et al. (2012). Em seguida, previamente à inoculação da bactéria, foi feita a profilaxia da cavidade oral com clorexidina e a superfície dental foi recoberta com saliva humana. Células da linhagem NG8 de *S. mutans* foram então inoculadas com micropipeta na cavidade oral e após 6 horas amostras deste sítio foram coletadas com auxílio de *swab*. As amostras orais foram plaqueadas em ágar Mitis-Salivarius contendo bacitracina (0,2 U/ml) e sacarose (5%) e incubadas conforme descrito no ensaio anterior. As UFCs recuperadas da cavidade oral dos animais foram contadas, para determinar o número de células de *S. mutans* recuperadas.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Clonagem e subclonagem do gene *pstS*

Inicialmente, o gene *pstS* foi amplificado através de reação de PCR, a partir do DNA genômico da linhagem UA 159 de *S. mutans*. Esta reação resultou em uma banda com tamanho molecular aproximado de 800 pb compatível com o tamanho esperado para o gene *pstS*, como pode ser observado na figura 4A. O fragmento de DNA amplificado foi então clonado no vetor pGEM T-easy, após ligação, conforme instruções do fabricante, e o produto desta ligação foi transformado na linhagem DH5 $\alpha$  de *E. coli* K12. A correta inserção do gene *pstS* foi confirmada por meio de análise de restrição do DNA plasmidial extraído, após lise alcalina. A reação de restrição empregando as enzimas *Bam*HI e *Xho*I, gerou duas bandas, uma maior de 3 Kb relativa ao vetor pGEM T-easy e outra com aproximadamente 800 pb, correspondendo ao gene *pstS* (figura 4B), a construção foi então denominada de pGEM*pstS*.

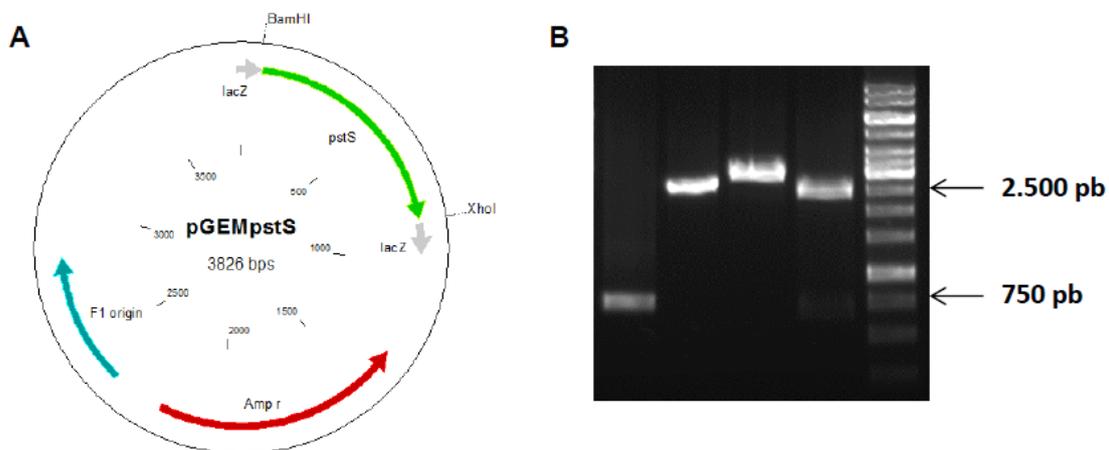


Figura 4. Construção do plasmídeo pGEM*pstS*. (A) Representação esquemática do plasmídeo pGEM*pstS*. A origem de replicação, os genes relevantes bem como os sítios de restrição do gene estão representados. (B) Análise eletroforética, por gel de agarose do perfil de restrição do plasmídeo pGEM*pstS*. 1) gene *pstS* amplificado; 2) plasmídeo pGEM T-easy (Promega®); 3) pGEM*pstS* linearizado com a enzima *Bam*HI; 4) pGEM*pstS* digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I; 5) 1kb DNA ladder (O'Gene Ruler<sup>TM</sup> –Fermentas<sup>®</sup>).

Para a subclonagem no vetor de expressão pET-28a (Novagen®) o fragmento correspondente ao gene *pstS* foi liberado do vetor pGEM*pstS*, através de digestão com *Bam*HI e *Xho*I, purificado e inserido no vetor pET-28a através de reação de ligação. A digestão do DNA plasmidial do clone recombinante com estas enzimas permitiu confirmar a subclonagem. A análise de restrição apresenta o fragmento correspondente ao gene *pstS* liberado do pGEM*pstS* e o vetor resultante (pET*pstS*) após tratamento com *Bam*HI e *Xho*I (figura 5). Esta construção foi posteriormente confirmada por sequenciamento e utilizada para obtenção da proteína recombinante.

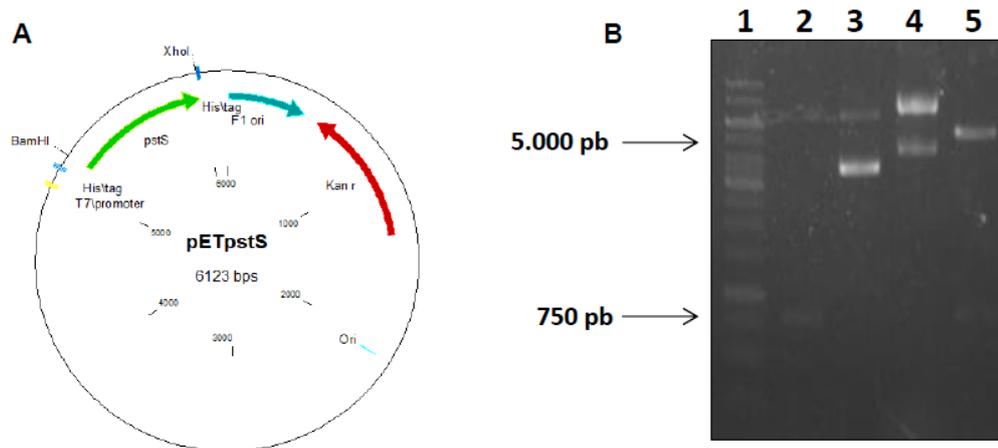


Figura 5. Construção do plasmídeo pET*pstS*. (A) Representação esquemática do plasmídeo pET*pstS*. A origem de replicação, os genes relevantes bem como os sítios de restrição do gene estão representados. (B) Análise eletroforética, por gel de agarose do perfil de restrição do plasmídeo pET*pstS*. 1) 1kb ladder (O'Gene Ruler<sup>TM</sup> –Fermentas<sup>®</sup>); 2) gene *pstS* purificado do vetor pGEM*pstS*; 3) pET-28a (Novagen®) íntegro; 4) pET*pstS* íntegro; 5) pET*pstS* digerido com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I.

#### 4.2 Expressão e purificação da proteína PstS recombinante

A expressão heteróloga da forma recombinante da proteína PstS, com cauda de histidina N-terminal, a partir da construção pET*pstS*, foi testada em cinco linhagens de *E. coli*: BL21 DE(3), BL21 (DE3) RIL, BL21 (DE3) RP, BL21(DE3) pLysS e BL21 (DE3) Star pLysS. Após transformação com o vetor de expressão, as linhagens foram cultivadas a 37 °C,

200 rpm, com 1 mM de IPTG e os extratos bacterianos antes e após adição do indutor foram analisados em gel SDS-PAGE. A proteína rPstS tem uma massa molecular predita de 32,7 kDa, no entanto não foi detectada uma banda com esta massa molecular nos extratos induzidos das quatro primeiras linhagens testadas (dados não mostrados).

Somente no extrato induzido da linhagem BL21 (DE3) Star pLysS observou-se uma banda de aproximadamente 35 kDa, ausente no extrato não induzido (figura 6A), indicando a superexpressão da proteína rPstS. Para confirmar se a banda correspondia a proteína de interesse, a reatividade dos extratos não induzido, induzido após 4 horas com IPTG e do extrato solúvel, obtido após lise química, foi testada frente a anticorpos monoclonais específicos contra a cauda de histidina (anti-*HisTag*), presente somente na proteína recombinante, através de *Western Blot* (figura 6B). A banda de 35 kDa foi reativa frente ao anticorpo anti-*HisTag* no extrato induzido e na fração solúvel, confirmando a expressão da proteína rPstS nas condições testadas, pela linhagem BL21 (DE3) Star pLysS, denominada então de BLPstS, e a sua localização na fração celular solúvel.

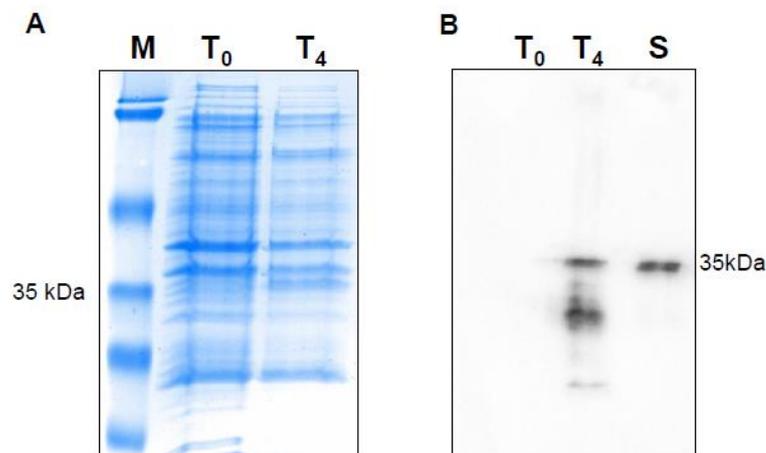


Figura 6. Expressão da proteína rPstS na linhagem *E. coli* BL 21 (DE3) Star pLysS. (A) Análise dos extratos induzido e não induzido por SDS-PAGE. Os extratos bacterianos antes (T<sub>0</sub>) e após (T<sub>4</sub>) a indução da expressão com IPTG foram analisados em gel SDS-PAGE 12,5%. (B) Avaliação da expressão da proteína rPstS por meio de *Western Blot*. A expressão da proteína foi confirmada empregando o anticorpo anti-*HisTag* frente aos extratos pré (T<sub>0</sub>) e pós (T<sub>4</sub>) indução, além da fração solúvel (S) do extrato T<sub>4</sub> obtido após lise. M: marcador de peso molecular de proteínas (PageRuler).

Em função da solubilidade da proteína rPstS no extrato da linhagem BLPstS, foi possível utilizar esta fração celular para a purificação da proteína. O extrato solúvel induzido da linhagem BLPstS foi submetido à cromatografia de afinidade ao níquel baseada na presença da cauda de histidina aminoterminal fusionada à sequência da proteína. O cromatograma apresentado na figura 7A representa a eluição da proteína da coluna de níquel frente a diferentes concentrações de imidazol e o gel de poliacrilamida (figura 7B) corresponde às amostras dos picos das diferentes concentrações de imidazol. Ao comparar o cromatograma e o respectivo gel de poliacrilamida nota-se que a proteína rPstS foi purificada preferencialmente na concentração de 200 mM (20%) de imidazol, com tamanho esperado de 35 kDa, sendo os picos gerados nas demais concentrações relativos à proteínas contaminantes com menor afinidade ao níquel. Ao final, foi possível obter a proteína rPstS em condições de pureza e concentração (0,4 mg/mL) adequadas para os ensaios posteriores.

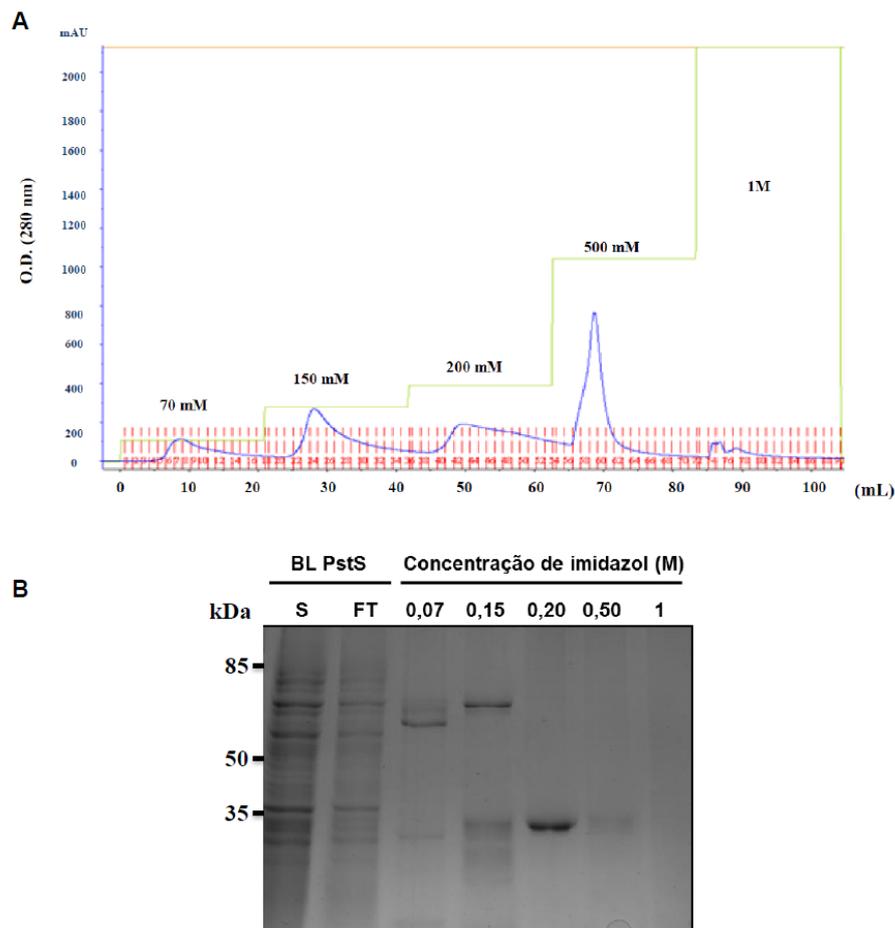


Figura 7. Purificação da proteína rPstS por cromatografia de afinidade ao níquel. O extrato bacteriano solúvel da linhagem BLPstS, após indução com IPTG, foi submetido à cromatografia de afinidade em Aktä – FPLC. (A) Cromatograma obtido após eluição com gradiente de imidazol. (B) Gel SDS-PAGE 12,5% das amostras referentes aos picos de cada concentração de imidazol utilizada na eluição da proteína. M: marcador de peso molecular de proteínas (PageRuler), S: fração solúvel do extrato bacteriano, FT: amostra coletada após a passagem na resina de níquel.

### 4.3 Características estruturais da proteína rPstS

A fim de determinar as características estruturais da forma recombinante da proteína PstS, após a purificação a proteína foi submetida a análises biofísicas, através de espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência. A análise dos dados da estrutura secundária da proteína rPstS revelou uma topologia  $\alpha/\beta$  compatível com proteínas ligadoras de transportadores ABC. Além disso, nota-se que na presença do ligante ( $P_iPO_4$ ), aparentemente, a estrutura secundária da proteína apresenta-se em um estado mais relaxado, com maior porcentagem de estruturas de dobramento aleatório em relação às estruturas em  $\alpha$ -

hélice ou folhas- $\beta$ , quando comparado à condição em que o ligante não está presente (Tabela 5).

Tabela 5 - Conteúdo da estrutura secundária da proteína PstS recombinante de *S. mutans*.

	$\alpha$ -Hélice	$\beta$ -Folha	Dobramento aleatório
PstS	48,0%	47,0%	5,0%
PstS + P <sub>i</sub> O <sub>4</sub>	36,3%	45,6%	18,1%

\*<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/process.shtml>

Os espectros obtidos por dicroísmo circular (CD) da proteína rPstS na presença ou na ausência do ligante (figura 8A) indicaram que a presença do fosfato causou grande alteração conformacional na estrutura secundária da proteína, porém manteve sua topologia  $\alpha/\beta$ . Possivelmente, esses dados refletem a interação entre a proteína rPstS e fosfato resultando em interações químicas reestruturadas no sítio de ligação da proteína. Também por dicroísmo circular foi possível avaliar o comportamento da proteína rPstS sob variações de temperatura (figura 8B). Nas duas condições já mencionadas, a proteína apresentou estabilidade quando submetida a variações crescentes de temperatura. Na presença de fosfato foi observado um aumento na temperatura de desenovelamento (73,6 °C) em relação à proteína na ausência do íon (72,6 °C). Por outro lado, a estrutura secundária da proteína rPstS não foi restabelecida após desnaturação térmica, uma vez que não houveram mudanças nos espectros após diminuição da temperatura.

A análise dos espectros da fluorescência da proteína rPstS (figura 8C) demonstrou que a presença de fosfato leva ao aumento da fluorescência intrínseca da proteína, o que indica uma perturbação no ambiente dos resíduos de triptofano, aminoácidos que agem como sonda intrínseca da proteína indicando alterações conformacionais. Contudo, essa perturbação não promoveu alteração do microambiente destes resíduos de aminoácidos, já que o comprimento de onda de maior intensidade do sinal permanece em 325 nm. Esses dados confirmam as alterações estruturais da proteína rPstS na presença do ligante já observadas nos ensaios de

CD, neste caso a modificação estrutural levou a uma maior exposição dos triptofanos e aumento da fluorescência observada.

Por modelagem molecular foi possível determinar um modelo em *cartoon* da proteína rPstS de *S. mutans* baseado na proteína ligadora de fosfato de *S. pneumoniae* (4EXL), que partilha 69% de resíduos em comum com seu órtólogo presente em *S. mutans* (figura 8D). No modelo à direita, os dois resíduos de triptofano na molécula da proteína rPstS estão destacados e à esquerda, apenas a superfície da molécula foi evidenciada. Ao comparar os dois modelos é possível inferir que os triptofanos estão localizados em regiões menos expostas ao solvente, enterrados na estrutura da molécula.

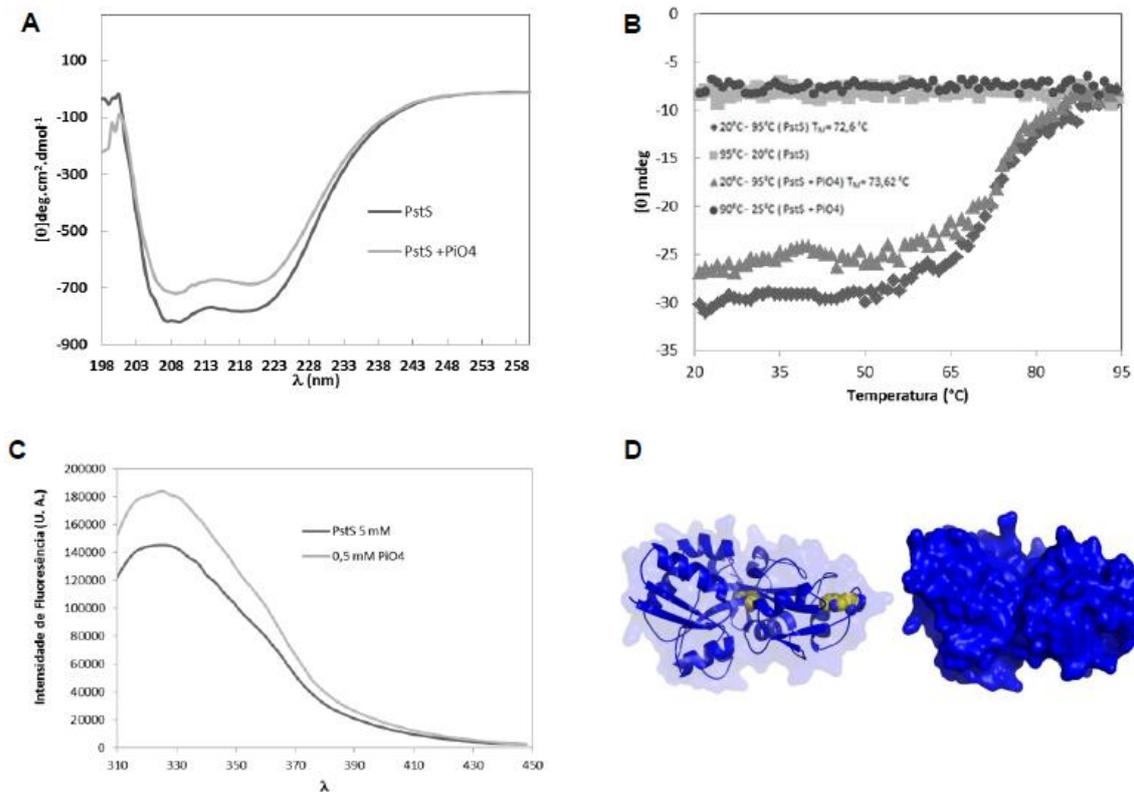


Figura 8. Caracterização estrutural da proteína PstS recombinante. Análises espectroscópicas foram realizadas com a proteína recombinante purificada na presença ou ausência do seu ligante. (A) Espectros obtidos através de dicroísmo circular com a proteína rPstS de *S. mutans* na presença (linha cinza) ou ausência (linha escura) de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . (B) Estabilidade estrutural frente à variação da temperatura de 20°C-95°C (círculos e quadrados); a análise do re-novelamento após desnaturação térmica foi realizada pela diminuição da temperatura de 95°C-20°C (triângulos e losangos). (C) Espectroscopia de fluorescência da proteína rPstS. A proteína recombinante apresentou um aumento na emissão de fluorescência intrínseca na presença de 0,5  $\mu\text{M}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (linha cinza).

Representação em *cartoon* da estrutura da proteína rPstS de *S. mutans* baseado no modelo do ortólogo PstS de *S. pneumoniae* (D), à esquerda os dois resíduos de triptofano estão destacados (em amarelo) e à direita a superfície da molécula da proteína é apresentada.

#### 4.4 Avaliação da antigenicidade da proteína rPstS

Sabendo que a proteína PstS recombinante produzida neste trabalho apresentava estrutura secundária característica de uma proteína ligadora de sistemas de transporte ABC e interação com o fosfato, a etapa seguinte do trabalho foi investigar a presença de determinantes antigênicos na estrutura da proteína rPstS. Para isso, foi testada a reatividade do soro gerado contra células inteiras da linhagem UA159 de *S. mutans* ( $\alpha$ -SMU) frente às formas intacta ou desnaturada pelo calor da proteína rPstS, por de ensaios de ELISA e *Dot Blot*.

No ensaio de ELISA (figura 9A), as duas formas da proteína rPstS utilizadas como antígeno de fase sólida foram reconhecidas pelos anticorpos  $\alpha$ -SMU, porém uma diminuição da reatividade foi observada quando a proteína foi desnaturada pelo calor. Resultados semelhantes foram obtidos no *Dot Blot* (figura 9B), o soro reconheceu as duas formas da proteína, porém apresentou maior reatividade frente à forma intacta da PstS recombinante. Neste último ensaio foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, a proteína P1<sub>39-512</sub>, um fragmento derivado da proteína P1, principal antígeno de superfície de *S. mutans*, e a toxina termo-lábil de ETEC. Esses dados indicam que a forma recombinante da proteína PstS produzida conservou epítomos antigênicos, sendo os epítomos conformacionais especialmente importantes no seu reconhecimento pelo sistema imune.

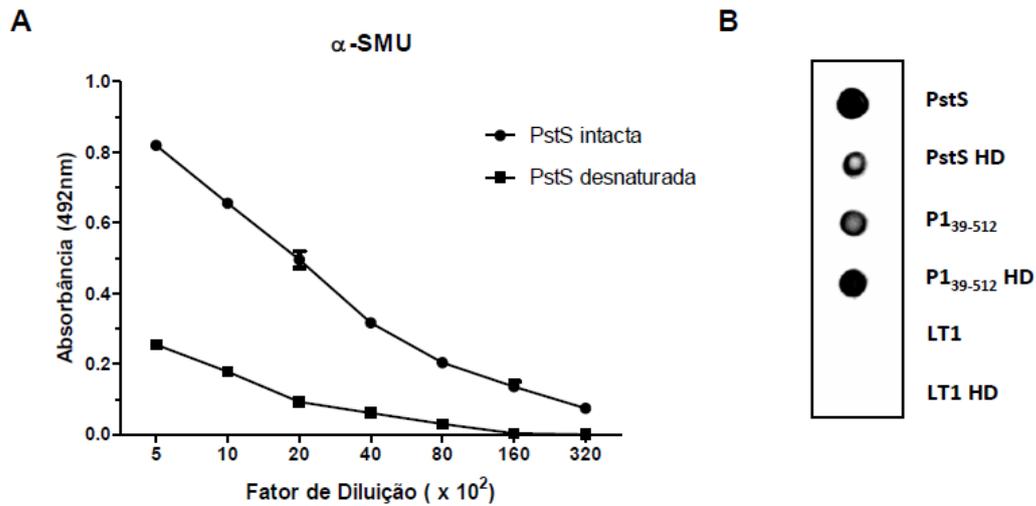


Figura 9. Avaliação da antigenicidade da proteína rPstS. (A) Reatividade do soro gerado contra a célula inteira de *S. mutans* frente às formas solúvel e desnaturada da proteína recombinante, através de ELISA. (B) Imunodeteccção por *Dot Blot* da proteína rPstS (2 $\mu$ g) por anticorpos anti-SMU nas formas solúvel e desnaturada por fervura (HD), foram utilizados também a proteína P1<sub>39-512</sub> e da proteína LT1 (2 $\mu$ g) como controles positivo e negativo, respectivamente.

#### 4.5 Imunogenicidade da proteína rPstS em após administração pela via sublingual

O potencial da proteína rPstS em estimular o sistema imune foi avaliado após regime de imunização administrado por uma via de mucosa. Grupos de camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados com a proteína rPstS co-administrada ou não ao adjuvante de mucosa LTK4R, em um regime de três doses pela via sublingual, pela aplicação tópica sob a língua dos animais previamente anestesiados. A resposta de anticorpos IgG específica contra a proteína recombinante PstS foi analisada por ELISA após cada dose, usando o *pool* dos soros dos animais imunizados de cada grupo.

Um aumento nos níveis de IgG PstS-específica foi observado no soro dos animais imunizados com a proteína pura ou combinada à LTK4R. A rPstS pura aumentou a resposta humoral somente após a terceira dose, enquanto que no grupo com o adjuvante observa-se que anticorpos específicos foram obtidos já após a segunda dose, além de um incremento após a terceira dose (figura 10A). Os níveis das subclasses de IgG também foram dosados e a razão IgG1/IgG2a determinada nos grupos vacinais (figura 10B). A imunização com a proteína

rPstS pura ou combinada com a LTK4R estimulou altos níveis da subclasse IgG1, indicando uma resposta imunológica do tipo Th2 (humoral).

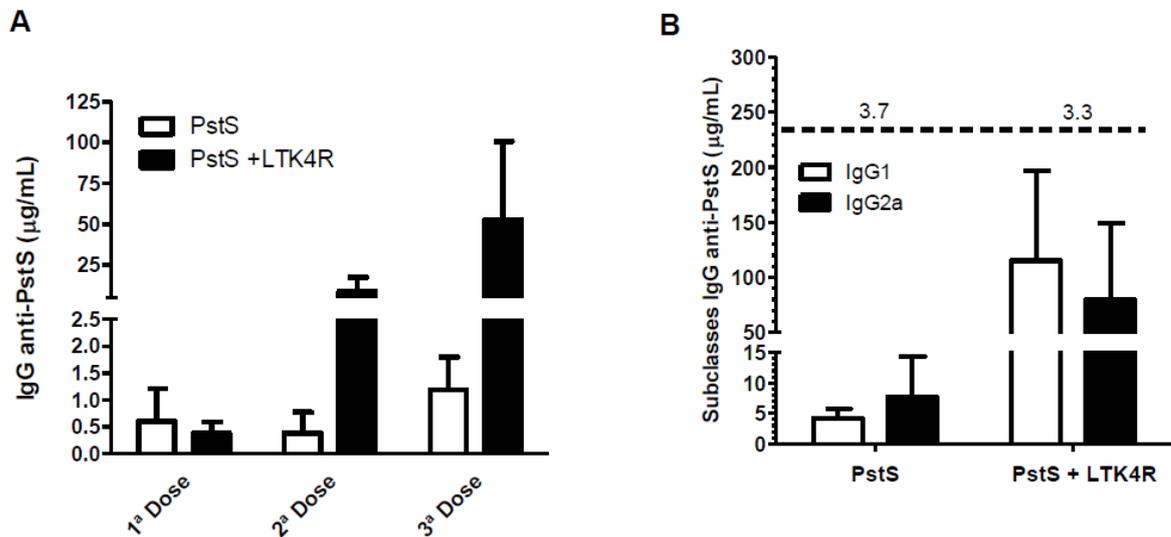


Figura 10. Resposta imune humoral PstS-específica. (A) Anticorpos IgG anti-PstS. Amostras de soro dos camundongos BALB/c imunizados pela via sublingual com 5 µg de rPstS (barras brancas) ou em combinação com 1 µg de LTK4R (barras pretas) foram coletadas duas semanas após cada dose e analisadas através de ELISA. (B) Subclasses de IgG anti-PstS. Após o protocolo vacinal completo, o nível e a razão das subclasses de IgG (IgG1:IgG2a) foi determinado no soro dos animais. Os ensaios de ELISA foram realizados com o *pool* dos soros, utilizando a proteína rPstS purificada como antígeno de fase sólida nas placas. Os dados são representativos de três experimentos de imunização independentes e expressos como média ± SE.

A fim de avaliar a resposta imune de mucosa induzida pela imunização sublingual com a proteína rPstS, foi determinada a presença de células secretoras de anticorpos (CSA) IgA antígeno-específicas nos baços e linfonodos cervicais (LNC) dos animais imunizados após a última dose. A rPstS sozinha foi capaz de estimular altos níveis de CSA- IgA no baço (figura 11A) dos animais imunizados comparado ao grupo com adjuvante. Por outro lado, nos LNCs as duas formulações vacinais, a proteína pura ou combinada ao adjuvante, foram capazes de ativar CSA-IgA PstS-específicas (figura 11B). Apesar de identificarmos as células secretoras de IgA específicas, não foi possível quantificar os níveis desse anticorpo na saliva dos animais imunizados após a última dose.

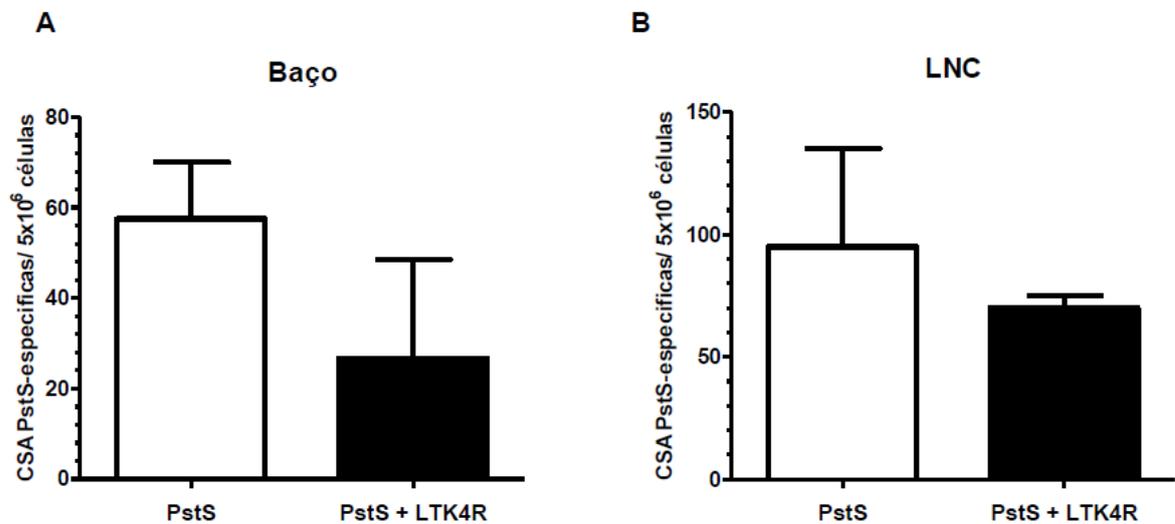


Figura 11. Células secretoras de anticorpos IgA PstS-específicas. O número de células de memória secretoras de IgA antígeno-específicas foi determinado no baço (A) e nos linfonodos cervicais (B) dos animais. Quinze dias após a última dose, os baços e linfonodos cervicais (LNC) dos animais foram removidos assepticamente e submetidos a ensaio de ELISPOT (em *pool*) na presença ou ausência de estímulo (5  $\mu$ g de rPstS).

Finalmente, também foram determinados os níveis das citocinas interleucina 6 (IL-6) e IFN $\gamma$  nos sobrenadantes das culturas de células de baço e LNC coletadas após o protocolo vacinal completo e estimuladas *in vitro* com rPstS (figura 12). Os animais que receberam apenas a proteína apresentaram altos níveis de IL-6 no baço e, principalmente, nos LNCs, como confirmado pela razão IL6/ IFN $\gamma$ . Por outro lado, a combinação da rPstS com a LTK4R promoveu um balanço nos níveis de IL-6 e IFN $\gamma$  tanto no baço, quanto no LNC.

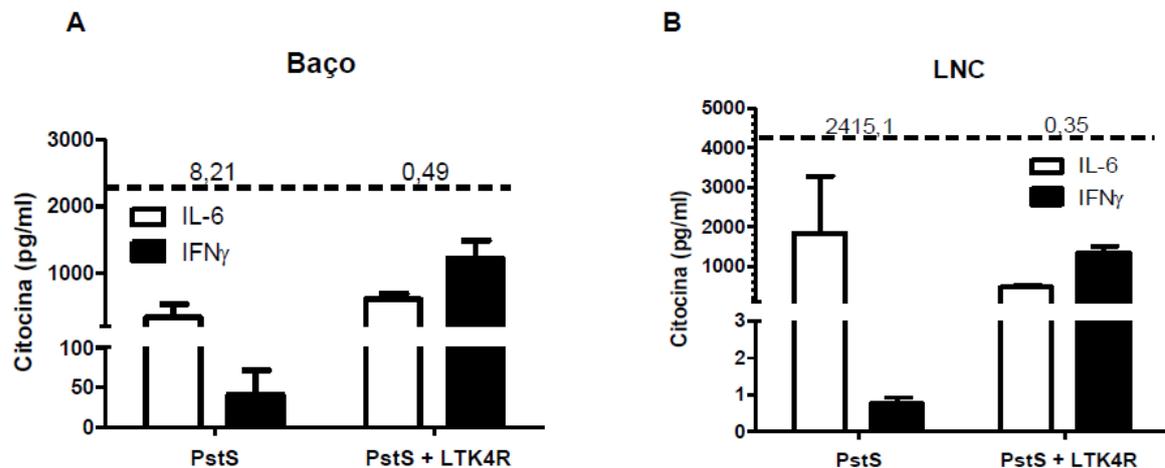


Figura 12. Perfil de secreção de citocinas. Os níveis das citocinas IL-6 e IFN $\gamma$ , bem com a razão IL-6:IFN $\gamma$ , foram determinados ao final do protocolo de imunização sublingual. O sobrenadante das células do baço e dos linfonodos cervicais, estimuladas *in vitro* com a proteína rPstS (5  $\mu$ g) por 72 horas, foi submetido ao ensaio de CBA (cytometric beads assay) de acordo com as instruções do fabricante. Os dados são representativos de dois experimentos conduzidos separadamente e estão expressos como média  $\pm$  SE.

#### 4.6 Funcionalidade *in vivo* dos anticorpos rPstS-específicos

Para determinar a funcionalidade dos anticorpos PstS-específicos obtidos após a imunização, a capacidade desses anticorpos interferirem na colonização oral de camundongos BALB/c por *S. mutans* foi avaliada em ensaios de soro-neutralização *in vivo* e desafio. Para o ensaio de soro-neutralização, células da linhagem NG8 de *S. mutans* foram pré-incubadas com o *pool* dos soros dos animais imunizados, coletados após a terceira dose, e em seguida inoculadas na cavidade oral dos camundongos *naïve*, previamente tratada como descrito anteriormente.

A quantidade de células de *S. mutans* recuperadas da cavidade oral é apresentada na figura 13. Os animais inoculados com a bactéria pré-incubada com os anticorpos  $\alpha$ -PstS ou  $\alpha$ -PstS + LTK4R apresentaram redução nos níveis do patógeno na cavidade oral após 6 horas, cerca de  $1,2 \times 10^3$  UFC e  $9,3 \times 10^2$  UFC, respectivamente, comparado com o grupo que recebeu a bactéria sem tratamento ( $1,0 \times 10^4$  UFC) ou as células pré-incubadas com  $\alpha$ -PBS (soro controle) ( $1,3 \times 10^4$  UFC).

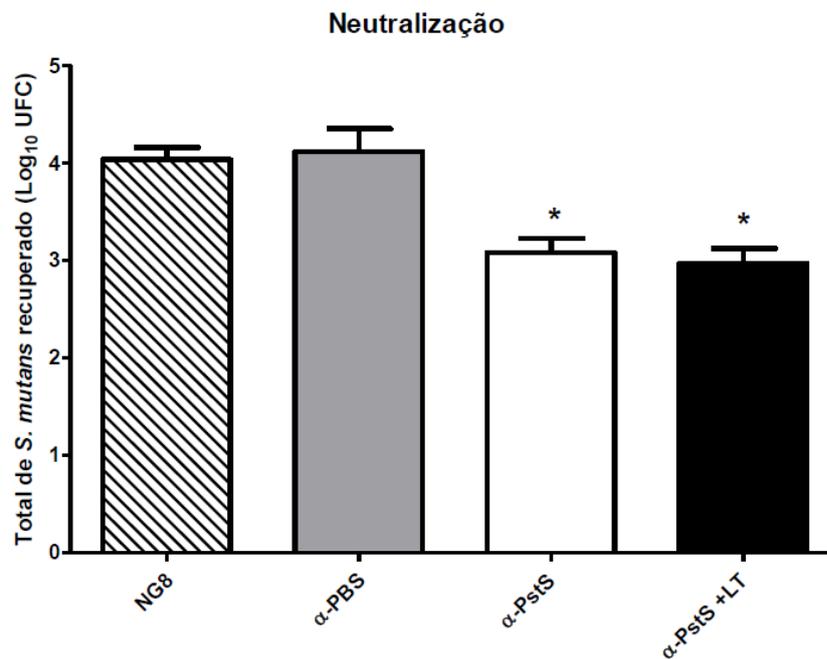


Figura 13. Soro-neutralização *in vivo* da adesão de *S. mutans* à cavidade oral de camundongos. Camundongos BALB/c *naive* (n=5) foram submetidos a um pré-tratamento oral com clorexidina e em seguida a superfície dental foi recoberta com saliva humana. Células de *S. mutans* previamente incubadas com o soro dos grupos vacinais (*pool* da terceira dose) diluído (1/100) foram inoculadas na cavidade oral dos animais com micropipeta. Amostras foram coletadas após 6 horas com *swab* e plaqueadas em ágar Mitis-salivarius contendo bacitracina (0,2 U/ml) e sacarose (5%). As placas foram incubadas a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> por no mínimo 48 horas. Células de *S. mutans* pré-incubadas com soro PBS ou não tratadas foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. \*p < 0,05 (one-way ANOVA e *Bonferroni posttest*).

Também foi determinado se os animais imunizados pela via sublingual seriam capazes de prevenir ativamente a colonização oral por *S. mutans*. Para isso, três semanas após a última dose os camundongos foram submetidos à profilaxia oral e inoculação da bactéria conforme descrito nos materiais e métodos. Da mesma forma que foi observada no ensaio de neutralização, uma diminuição na carga oral de bactéria foi observada nos grupos imunizados com a rPstS sozinha ( $5,8 \times 10^3$ ) ou combinada ao adjuvante de mucosa ( $3,9 \times 10^3$ ), comparado com o grupo controle PBS ( $3,0 \times 10^4$ ) (figura 14).

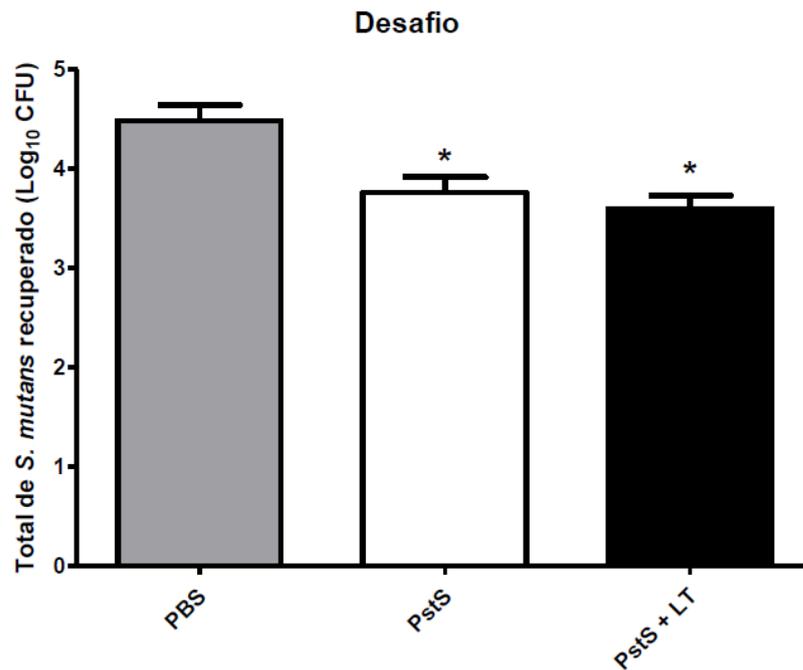


Figura 14. Inibição da colonização oral de camundongos por *S. mutans*. Três semanas após a última dose do protocolo vacinal sublingual, os animais foram pré-tratados com clorexidina e saliva humana, e em seguida desafiados com células da linhagem NG8 de *S. mutans*. Swabs da cavidade oral foram coletados após 6 horas da inoculação e plaqueados em ágar Mitis-salivarius contendo bacitracina (0,2 U/ml) e sacarose (5%). Após incubação a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> por no mínimo 48 horas, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas. Os dados representam três experimentos independentes e são apresentados como média ± SE. \*p < 0,05 (one-way ANOVA e *Bonferroni posttest*).

## 5 DISCUSSÃO

A bactéria *Streptococcus mutans* é o principal agente etiológico microbiano associado à cárie dental em humanos, uma doença que ainda acomete milhares de indivíduos ao redor do mundo, apesar das variadas medidas profiláticas existentes. O controle vacinal da carie é um esforço antigo e mesmo após diversas estratégias já terem sido propostas, ainda não há uma vacina disponível para uso em humanos. Na busca de novos antígenos a serem testados em estratégias vacinais contra a carie, a proteína PstS apresenta-se como candidato interessante, pois, além do seu papel fisiológico na captação de fosfato inorgânico, exerce influência na capacidade *in vitro* de adesão e produção de biofilme por *S. mutans* (LUZ et al., 2012); fatores fundamentais para a patogênese da cárie dental.

Na presente dissertação de mestrado, a forma recombinante do componente ligador do sistema Pst de captação de fosfato inorgânico (rPstS) foi obtida a partir de sistema de expressão procarioto e purificada na sua forma solúvel. Análises biofísicas da proteína rPstS purificada indicaram a conservação de estrutura secundária semelhante a outros componentes ligadores de sistemas de transporte ABC e a reatividade com anticorpos gerados contra a célula inteira de *S. mutans* confirmaram a presença de epítomos da proteína nativa na forma recombinante produzida. Além disso, a proteína rPstS foi utilizada como antígeno em estratégias vacinais de mucosa, pela via sublingual, mostrando-se imunogênica e estimulando a geração de anticorpos específicos capazes de interferir com a adesão de *S. mutans* à superfície dental *in vivo*.

Inicialmente o gene que codifica a proteína PstS, obtido a partir da linhagem UA159 de *S. mutans*, foi clonado no vetor pET28a de modo a obter uma proteína de fusão com cauda de histidina amino-terminal. Após a construção do vetor pET $pstS$ , a expressão da proteína recombinante foi testada em diferentes linhagens de *E. coli* próprias para expressão de proteínas heterólogas. Os sistemas de expressão de proteínas recombinantes baseados em linhagens de *E. coli* são amplamente utilizados devido principalmente a rápida multiplicação celular e alta velocidade de produção de proteínas (SWARTZ, 2001). Foram utilizadas desde a linhagem BL21(DE3) recomendada genericamente para obtenção de altos níveis de expressão de genes heterólogos, até linhagens com características genéticas que permitem uma regulação mais refinada da expressão das proteínas recombinantes.

A proteína rPstS foi expressa na linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) Star pLysS, denominada então BLPstS, na fração solúvel do extrato celular desta bactéria. Esta linhagem é recomendada para a expressão de genes tóxicos ou genes cujos produtos possam interferir com o crescimento bacteriano, devido a suas características: (i) ausência de duas proteases, reduzindo as chances de degradação da proteína expressa; (ii) uma RNaseE truncada que aumenta a estabilidade do RNA mensageiro; e (iii) o plasmídeo pLysS codificando a lisozima T7 responsável por degradar parte da T7 RNA polimerase disponível. No caso da proteína rPstS produzida apresentar atividade biológica, sua capacidade de ligação ao fosfato reduziria os níveis intracelulares deste íon, prejudicando algumas funções biológicas básicas na linhagem de expressão. Sendo assim, as características da linhagem BL21 (DE3) Star pLysS em conjunto, presentes separadamente nas outras linhagens testadas, favoreceram a expressão da proteína PstS recombinante.

A purificação do extrato celular solúvel da linhagem BLPstS induzido, por cromatografia de afinidade, resultou em uma amostra de proteína purificada adequada para realização dos ensaios estruturais, de antigenicidade e de avaliação da imunogenicidade. As análises biofísicas por espectroscopia de dicroísmo circular e fluorescência permitiram confirmar a estrutura secundária da proteína PstS recombinante produzida neste trabalho, a qual se mostrou compatível com a de outros componentes ligadores de transportadores ABC. A proporção de componentes da estrutura secundária encontrada na proteína rPstS foi próxima a observada em outras proteínas ligadoras, como na forma truncada da PstS-1 de *Mycobacterium tuberculosis* (KHURSHID et al., 2013) e também a observada na MBP de *Xanthomonas citri* (BALAN et al., 2005).

O comportamento da proteína rPstS no ensaio de dicroísmo circular revelou modificação da estrutura secundária da proteína na presença do fosfato, algo também observado em outras proteínas ligadoras quando na presença de seus ligantes (BALAN et al., 2005; SANTACRUZ-PEREZ et al., 2013), o que indica que a proteína PstS recombinante foi capaz de interagir com seu ligante fosfato. Outro fato observado pelo CD foi que mesmo submetida a variações crescentes na temperatura a proteína apresentou alta estabilidade estrutural, apesar de não recuperar sua conformação após desnaturação. Esses dados, somados à análise do conteúdo de estrutura secundária, evidenciam que as alterações estruturais sofridas na presença de fosfato não modificaram a estabilidade da proteína de forma significativa.

A fluorescência da proteína rPstS revelou que os triptofanos da proteína estão enterrados na estrutura da molécula e que embora tenham seu microambiente perturbado pela interação com o fosfato, a estrutura terciária da proteína não os expõem. Esses dados indicam que a dinâmica estrutural da proteína PstS recombinante apresenta um forte rearranjo da estrutura secundária na presença do ligante, conforme observado nos ensaios de CD. No entanto, este rearranjo não expõe resíduos enterrados na estrutura e tampouco aumenta a estabilidade da molécula decorrente da interação.

Além da preservação da estrutura, buscamos identificar a presença de determinantes antigênicos na forma recombinante da PstS produzida que permitissem seu reconhecimento pelo sistema imunológico. Nos dois ensaios de imunodeteção realizados, a proteína rPstS foi reconhecida pelo soro anti-SMU na forma desnaturada ou com sua estrutura intacta, sendo possível notar a diferença na reatividade entre as duas formas, especialmente no ELISA em que diluições maiores dos anticorpos apresentavam maior reatividade com a forma intacta. Essa diferença na reatividade demonstra que o mesmo reconhece preferencialmente epítomos complexos termo-sensíveis, preservados na proteína recombinante. A reatividade com a proteína rPstS desnaturada, aponta para a presença também de anticorpos direcionados contra epítomos lineares dessa proteína. Estes dados em conjunto indicam que a proteína rPstS gerada a partir de uma linhagem recombinante de *E. coli* apresenta características antigênicas e preserva epítomos conformacionais semelhantes aos da proteína nativa.

Os determinantes antigênicos de um candidato vacinal, além de serem reconhecidos pelo sistema imunológico, precisam ser capazes de estimular o sistema a montar uma resposta imune contra o patógeno, a partir do antígeno apresentado. A imunogenicidade da proteína rPstS foi avaliada em uma estratégia de mucosa, baseada na via sublingual. As vias de mucosa são ideais para indução de resposta imune nos sítios de entrada de diferentes patógenos, sendo capazes de interferir com as etapas iniciais de colonização. Considerando o sítio de infecção de *S. mutans*, a via sublingual se mostra adequada por ser capaz de estimular os mecanismos da resposta imune na cavidade oral.

A utilização da proteína rPstS em um protocolo vacinal de mucosa revelou as propriedades imunogênicas desta proteína pela via sublingual. A proteína recombinante foi capaz de estimular a geração de anticorpos específicos após administração de três doses. No entanto, essa resposta humoral foi significativamente aumentada pela co-administração com um adjuvante de mucosa, a LTK4R. Esses dados apontam para uma baixa imunogenicidade

da proteína e reforça a necessidade do uso de adjuvantes adequados para ampliar a magnitude da resposta. Outro aspecto da resposta imune observado foi o perfil de subclasses de IgG, a proteína sozinha e a combinada à LTK4R apresentaram uma produção maior dos níveis de IgG1, indicando a tendência para um perfil Th2 com a ativação da resposta imunológica humoral.

Além de estimular a produção de anticorpos sistêmicos o protocolo vacinal sublingual com a rPstS foi também capaz de estimular componentes do sistema imune de mucosa da cavidade oral. Observamos indução de células secretoras de anticorpos IgA-específicos nos linfonodos cervicais, sítios locais de geração da resposta imune, e também nos baços dos animais imunizados. Esses dados indicam que a proteína rPstS quando administrada pela via sublingual é capaz de desencadear uma resposta imunológica de mucosa, além de uma resposta humoral sistêmica.

Este fato foi confirmado pelo perfil de citocinas secretadas pelos LNCs e baços que corroborou o perfil de subclasses de IgG encontrado. Maiores níveis de IL-6 foram dosados nos LNCs e baços dos animais que receberam a proteína sozinha, além disso, a razão IL-6/IFN $\gamma$  confirmou uma resposta mais polarizada para Th2. Nos órgãos dos animais em que a proteína foi co-administrada com o adjuvante observamos um aumento nos níveis de IFN $\gamma$ , além de uma razão IL-6/IFN $\gamma$  significativamente menor. No entanto, esse aumento apenas equilibrou os níveis das duas citocinas, não alterando a polarização da resposta para o braço celular da resposta imune.

O estímulo dessa resposta humoral de mucosa seria importante para controlar o início da colonização do dente por *S. mutans* a partir da ação dos anticorpos gerados neste sítio. Apesar de não terem sido detectados níveis de IgA na saliva dos animais imunizados, a presença das células secretoras de IgA específica confirma a ativação da resposta de mucosa e o fato destas células serem de memória indica a longevidade do estímulo gerado pela formulação vacinal. Nieminen et al., (1998) observaram uma correlação positiva entre a presença de CSA IgA no sangue periférico e níveis de IgA na saliva de voluntários imunizados com duas formulações vacinais contra *S. pneumoniae*. Neste mesmo trabalho eles já destacam as dificuldades em dosar anticorpos secretados nas mucosas, entre elas a pouca quantidade de secreção muitas vezes obtida e a variação diária dos anticorpos nas secreções, o que pode ter influenciado também nossa dosagem de IgA na saliva dos animais imunizados.

A imunização sublingual é eficaz na indução de respostas imunes sistêmicas e de mucosa, tanto humoral quanto celular citotóxica (CZERKINSKY et al., 2011). Diferentes estudos pré-clínicos com vários tipos de antígenos também observaram a plasticidade desta via na indução de resposta imune. Utilizando o antígeno modelo ovoalbumina (OVA) em combinação com a toxina colérica (CT) ou sozinha, Çuburu e colaboradores em 2007 foram capazes de induzir resposta humoral de mucosa e sistêmica em camundongos. Anticorpos IgA específicos foram identificados nas mucosas pulmonar, nasal e sublingual, além de células secretoras de IgA no pulmão, baço e linfonodos mesentéricos e submandibulares, confirmando a ativação da resposta imune na mucosa local. Nesse mesmo trabalho também se observou que a imunização sublingual foi eficaz na indução de resposta citotóxica efetora em órgãos linfoides periféricos e sítios de mucosa. Utilizando outra abordagem, Amuguni et al. (2011) induziram anticorpos IgG e IgA contra o fragmento C da toxina tetânica (TTFC), a partir da imunização sublingual com células de *Bacillus subtilis* expressando este antígeno. Os anticorpos IgG se mostraram protetores no desafio letal com a toxina tetânica e níveis de IgA foram identificados não só na saliva, mas também no lavado vaginal e fezes dos animais imunizados.

Outro ponto importante observado neste trabalho foram os aspectos funcionais dos anticorpos obtidos após o protocolo vacinal. Em dois ensaios *in vivo* observamos a capacidade dos anticorpos anti PstS-específicos interferirem com a colonização da cavidade oral da linhagem NG8 de *S. mutans*. Num primeiro momento, inoculamos a bactéria pré-incubada com uma diluição específica dos soros imunes (IgG) na cavidade oral de camundongos *naïve*, sem contato prévio com o antígeno ou a bactéria. A redução nos níveis de bactéria recuperados da cavidade oral dos animais, nos casos em que a bactéria fora pré-incubada com os soros aponta para a capacidade neutralizante dos anticorpos gerados com a rPstS, interferindo na colonização oral *in vivo* de *S. mutans*.

No outro ensaio realizado com os animais vacinados observamos que os anticorpos produzidos após imunização também interferem com a colonização de *S. mutans* na cavidade oral dos animais, levando a uma redução dos níveis de bactérias recuperados daqueles que receberam o protocolo vacinal, ou seja, a estratégia vacinal de mucosa desenvolvida contra a proteína rPstS foi capaz de reduzir a colonização oral murina por *S. mutans*. Nos dois ensaios não se observou diferença no uso da proteína rPstS pura ou combinada ao adjuvante LTK4R, quanto a funcionalidade dos anticorpos frente a colonização por *S. mutans*. Apesar de ter

aumentado a concentração dos anticorpos IgG específicos, a combinação com o adjuvante não levou a geração de anticorpos com propriedades funcionais aumentadas em relação aos produzidos apenas com a proteína.

Mesmo não se tratando de anticorpos de mucosa, os anticorpos IgG estão disponíveis na cavidade oral a partir do fluido crevicular e como demonstrado são capazes de bloquear a etapa inicial da colonização do dente por *S. mutans*, podendo contribuir para a redução dos níveis desta bactéria no dente e lesões decorrentes da sua presença. Isso aponta para a possibilidade de indução de uma resposta imune eficaz no controle da cárie dental, a partir do uso da proteína PstS como antígeno vacinal.

Alguns ensaios funcionais de estratégias que utilizaram transportadores ABC como antígeno também obtiveram sucesso. Em 1999, Tanghe e colaboradores avaliaram a imunogenicidade de ortólogos da proteína PstS encontrados em *Mycobacterium tuberculosis* através de vacinas de DNA. Os animais imunizados com o gene de um desses ortólogos apresentaram redução significativa na quantidade de bactérias recuperadas do baço e pulmões. Brown et al. (2001) utilizaram as proteínas PiuA e PiaA, componentes de transportadores de ferro de *S. pneumoniae*, como antígenos vacinais pela via intraperitoneal e observaram proteção nos animais imunizados após desafio sistêmico com a bactéria.

Em outro trabalho, Tanabe et al. (2006) imunizaram camundongos com a OppA de *Yersinia pestis*, após desafio subcutâneo com uma cepa virulenta desta bactéria os animais imunizados apresentaram aumento da sobrevivência. Imunidade protetora também foi observada contra *Moraxella catarrhalis* por Yang et al. (2011), utilizando um modelo murinho de eliminação pulmonar deste patógeno, em que animais imunizados com a OppA por via intranasal apresentaram maior taxa de eliminação da bactéria dos pulmões.

Os dados descritos neste trabalho são promissores no que diz respeito à identificação de um novo antígeno vacinal contra *S. mutans* que pode ser explorado em abordagens vacinais contra a cárie dental. A obtenção do antígeno na forma solúvel favoreceu a manutenção de uma estrutura semelhante a do antígeno nativo e garantiu a preservação de epítomos importantes, capazes de estimular uma resposta imune específica. Ademais destacamos o uso da via sublingual como rota de imunização, mais fácil e segura, que também favorece um estímulo aos componentes imunes do sítio de mucosa mais próximo ao ambiente ocupado pela bactéria, garantindo mecanismos efetores da imunidade no sítio de infecção.

## 6 CONCLUSÕES

A obtenção da forma recombinante da proteína PstS de *S. mutans* em sistema procarioto, a partir da fração solúvel, permitiu a preservação da estrutura da proteína e dos epítomos imunodominantes presentes na sua forma nativa.

A proteína rPstS foi capaz de estimular o sistema imune após administração sublingual, em um protocolo vacinal de mucosa, desencadeando uma resposta humoral sistêmica e local, a qual foi potencializada com a adição do adjuvante LTK4R à formulação.

Os anticorpos rPstS-específicos produzidos a partir da estratégia vacinal de mucosa foram eficientes em interferir na capacidade de colonização oral por *S. mutans* em modelo murino.

A proteína PstS, enquanto antígeno, é capaz de induzir geração de anticorpos com atividade neutralizante das etapas iniciais da colonização oral por *S. mutans* e pode ser explorada em abordagens vacinais contra a cárie dental humana.

## REFERÊNCIAS\*

- AJDÍC, D.; MCSHAN, W. M.; MCLAUGHLIN, R. E.; SAVIC, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; JIA, H.; LIN, S.; QIAN, Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B. A.; FERRETTI, J. J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA 159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 22, p. 14434-14439, 2002.
- AMUGUNI, J. H.; LEE, S.; KERSTEIN, K. O.; BROWN, D. W.; BELITSKY, B. R.; HERRMANN, J. E.; KEUSCH, G. T.; SONENSHEIN, A. L.; TZIPORI, S. Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. **Vaccine**, v. 29, p. 4778-4784, 2011.
- BALAN, A.; SOUZA, C. S.; MOUTRAN, A.; FERREIRA, R. C. C.; FRANCO, C. S.; RAMOS, C. H. I.; FERREIRA, L. C. F. Purification and in vitro characterization of the maltose-binding protein of the plant pathogen *Xanthomonas citri*. **Protein Expression and Purification**, v. 43, p. 103–110, 2005.
- BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1267-1277, 2004.
- BATISTA, M. T.; SOUZA, R. D.; FERREIRA, E. L.; ROBINETTE, R.; Crowley, P. J.; RODRIGUES, J. F.; BRADY, 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. 4978-4988, 2014.
- BROWN, J. S.; GILLILAND, S. M.; HOLDEN, D. W. A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding ABC transporter involved in iron uptake and virulence. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 572–585, 2001.
- BROWN, J. S.; OGUNNIYI, A. D.; WOODROW, M. C.; HOLDEN, D. W.; PATON, J. C. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6702-6706, 2001.
- BURNE, R. A.; SCHILLING, K.; BOWEN, W. H.; YASBIN, R. E. Expression, purification, and characterization of an exo- $\beta$ -D-fructosidase of *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 10, p. 4507- 4517, 1987.
- ÇUBURU, N.; KWEON, M.; SONG, J.; HERVOUET, C.; LUCI, C.; SUN, J.; HOLFMAN, P.; HOLMGREN, J.; ANJUERE, F.; CZERKINSKY, C. Sublingual immunization induces broad-based systemic and mucosal immune responses in mice. **Vaccine**, v. 25, p. 8598-8610, 2005.

\*De acordo com:

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

- CZERKINSKY, C.; ÇUBURU, N.; KWEON, M.; ANJUERE, F.; HOLMGREN, J. Sublingual vaccination. **Human Vaccines**, v. 7, p.110-114, 2011.
- DASSA, E. ABC transport. In: LEDDENBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**. New York: Academic Press, 2000. v.1 p. 1-12.
- GARMORY, H. S.; TITBALL, R. W. ATP-Binding Cassette Transporters Are Targets for the Development of Antibacterial Vaccines and Therapies. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 12, p. 6757-6763, 2004.
- HAMADA, S.; SLADE H. D. Biology, immunology and carcinogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Review**, v. 44, n. 2, p. 331-384, 1980.
- HAMADA, S., KOGA, T., OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v. 63, n.3, p. 407-411, 1984.
- HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**., v. 8, p. 67-113, 1992.
- HIGGINS, C.F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 205-210, 2001.
- ITO, T.; MAEDA, T.; SENPUKU, H. Roles of salivary components in *Streptococcus mutans* colonization in a new animal model using NOD/SCID.e2f1<sup>-/-</sup> mice. **PlosOne**, v. 7 (2): e32063. doi:10.1371/journal.pone.0032063, 2012.
- KHURSHID, S.; KHALID, R.; AFZAL, M.; AKHTAR, W. Truncation of PstS1 antigen of *Mycobacterium tuberculosis* improves diagnostic efficiency. **Tuberculosis**, v. 93, p. 654-659, 2013.
- KRASTEL, K; SENADHEERA, D. B.; MAIR, R.; DOWNEY, J. S.; GOODMAN, S. D.; CVITKOVITCH, D. G. Characterization of a glutamate transporter operon, *glnQHMP*, in *Streptococcus mutans* and its role in acid tolerance. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 4, p. 984-993, 2010.
- LAMARCHE, M. G.; WARNNER, B. L.; CRÉPIN, S.; HAREL, J. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 461-473, 2008.
- LEMOS, J. A.; QUIVEY, R. G.; KOO, H.; ABRANCHES, J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? **Microbiology**, v. 159, p. 436-445, 2013.
- LINTON, K.J.; HIGGINS, C. F. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 5-13, 1998.
- LUZ, D. E.; NEPOMUCENO, R. S. L.; SPIRA, B.; FERREIRA, R. C. C. The Pst system of *Streptococcus mutans* is important for phosphate transport and adhesion to abiotic surfaces. **Molecular Oral Microbiology**, v. 27, p. 172-181, 2012.
- MICHALEK, S. M.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H.; OCHIAI, K.; MCGHEE, J. R. Oral Ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. **Infection and Immunity**, v. 33, n. 3, p. 690-696, 1981.

MOUTRAN, A.; QUAGGIO, R.B.; BALAN, A.; FERREIRA, L.C.S.; FERREIRA, R.C.C. The oligopeptide (Opp) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv.citri. **Current Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 354-359, 2003.

NIEMINEN, T.; KÄYHTY, H.; VIROLAINEN A.; ESKOLA J. Circulating antibody secreting cell response to parenteral pneumococcal vaccines as an indicator of salivary IgA antibody response. **Vaccine**, v. 16, p. 313-319, 1998.

NEPOMUCENO, R.S.L., TAVARES, M.B., LEMOS, J.A. ET AL. The oligopeptide (opp) gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence and characterization. **Oral Microbiology Immunology**, v. 22, n. 4, p. 277-284, 2007.

NOBBS, A. H.; LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. *Streptococcus* adherence and colonization. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, p. 407-450, 2009.

NOVAK, R.; CAUWELS, A.; CHARPENTIER, E.; TUOMANEN, E. Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1126-1133, 1999.

POLISSI, A.; PONTIGGIA, A.; FERGER, G.; ALTIERI, M.; MOTLL, H.; FERRARI, L.; SIMON, D. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 5620-5629, 1998.

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* (ETEC): Differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) and LT4 (pLT). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 7, pp. 5222-5233, 2011.

RUSSELL, M. W.; HAJISHENGALLIS, G.; CHILDERS, N. K.; MICHALEK, S. M. Secretory immunity in defense against cariogenic mutans streptococci. **Caries Research**, v. 33, p. 4-15, 1999.

RUSSELL, M. W.; CHILDERS, N. K.; MICHALEK, S. M.; SMITH, D. J.; TAUBMAN, M. A. A caries vaccine? The state of the science of immunization against dental caries. **Caries Research**, v.38, p. 230-235, 2004.

RUSSELL, R.R.B. Pathogenesis of oral streptococci. In: FISCHETTI, V. A.; NOVICK, R. P.; FERRETTI, J. J.; PORTNOY, D. A.; ROOD, J. I. eds. **Gram-positive Pathogens**. 2. ed. Washington, D. C: American Society of Microbiology, 2006. p. 332-337.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTACRUZ-PEREZ, C., PEGOS, V. R., HONORATO, R. V, VERLI, H., LINDAHL, E., BARBOSA, J. A. R. G., BALAN, A. A specific interdomain interaction preserves the structural and binding properties of the ModA protein from the phytopathogen *Xanthomonas citri* domain interaction and transport in ModA. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 539, n. 1, p. 20-30, 2013.

SHIVAKUMAR, K. M.; VIDYA, S. K.; CHANDU, G. N. Dental caries vaccine. **Indian Journal of Dental Research**, v. 20, p. 99–106, 2009.

SMITH, D. J. Caries vaccine for the twenty-first century. **Journal of Dental Education**, v.67, n. 10, p. 1130-1139, 2003.

SMITH, D. J. Dental caries vaccines: prospects and concerns. **Expert Reviews Vaccine**, v. 9, n. 1, p. 1-3, 2010.

SOUALHINE, H.; BROCHU, V.; MÉNARD, F.; PAPADOPOULOU, B.; WEISS, K.; BERGERON, M.G.; LÉGARÉ, D.; DRUMMELSMITH, J.; OUELLETTE, M. A proteomic analysis of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter. **Molecular microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1430-1440, 2005.

SWARTZ, J. R. Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 195–201, 2001.

TANABE, M.; ATKINS, H. S.; HARLAND, D. N.; ELVIN, E. J.; STAGG, A. J.; MIRZA, O.; TITBALL, R. W.; BYRNE, B.; BROWN, K. A. The ABC transporter protein OppA provides protection against experimental *Yersinia pestis* infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3687-3691, 2006.

TANGHE, A., P. LEFÈVRE, O. DENIS, S. D'SOUZA, M. BRAIBANT, E. LOZES, M. SINGH, D. MONTGOMERY, J. CONTENT, AND K. HUYGEN. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptor. **Journal of Immunology**, v. 162, p.1113–1119, 1999.

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, p. 131-142, 2010.

VAN VEEN, H.H. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 72, n. 4, p. 299-315, 1997.

YANG, M.; JOHNSON, A.; MURPHY, T. F. Characterization and evaluation of the *Moraxella catarrhalis* oligopeptide permease A as a mucosal vaccine antigen. **Infection and Immunity**, v. 79, n.2, p. 846-857, 2011.