

GISELA DE SOUZA PEREIRA

**A proteína ligadora de glutamato (GlnH) de *Streptococcus mutans* como  
alvo no desenvolvimento de estratégias vacinais de mucosa contra cárie  
dental humana**

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

São Paulo

2018

GISELA DE SOUZA PEREIRA

**A proteína ligadora de glutamato (GlnH) de *Streptococcus mutans* como  
alvo no desenvolvimento de estratégias vacinais de mucosa contra cárie  
dental humana**

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Café Ferreira

Versão original

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Souza Pereira, Gisela

A proteína ligadora de glutamato (GlnH) de  
Streptococcus mutans como alvo no desenvolvimento  
de estratégias vacinais de mucosa contra cárie  
dental humana / Gisela de Souza Pereira;  
orientadora Rita de Cássia Café Ferreira. -- São  
Paulo, 2018.

99 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Streptococcus mutans. 2. Cárie dental. 3.  
Vacinas de mucosa. 4. Bacillus subtilis. 5.  
Imunização sublingual . I. de Cássia Café Ferreira,  
Rita, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): **Gisela de Souza Pereira**

Título da Dissertação/Tese: A proteína ligadora de glutamato (GlnH) de *Streptococcus mutans* como alvo no desenvolvimento de estratégias vacinais de mucosa contra a cárie dental humana

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rita de Cassia Café Ferreira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o (a) candidato (a):

**( ) Aprovado(a)**

**( ) Reprovado(a)**

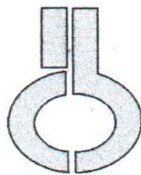
Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

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

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

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 **69** nas fls. **20** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Rita de Cássia Café Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*A proteína ligadora de glutamato (GlnH) de Streptococcus mutans como alvo no desenvolvimento de estratégias vacinais de mucosa contra a cárie dental humana*" do qual participam o(s) aluno(s) **Ewerton Lucena Ferreira, Gisela de Souza Pereira, os colaboradores Milene Tavares Batista, Hélic Moreira Passos, Dalva Adelina da Silva** 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 **27.08.2014, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 28 de agosto de 2014.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES  
Vice- Coordenador- CEUA- ICB/USP

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

## **DEDICATÓRIA**

À minha família, pai, irmão e principalmente minha mãe que estiveram ao meu lado em um dos momentos mais difíceis da minha vida e que se não fosse pelo suporte dessas pessoas tão importantes na minha vida, jamais conseguiria chegar aonde cheguei.

## AGRADECIMENTOS

Muitas são as pessoas que me ajudaram nessa caminhada, e cada uma delas teve um papel essencial para a conclusão dessa etapa tão importante em minha vida, portanto agradeço a todos que me ajudaram com o que puderam, palavras, abraços, momentos de distração tão necessários, e também momentos de silêncio e compreensão, amizade, amor, pensamentos, energias positivas enviadas...

Agradeço também toda ajuda e força recebida pelo Plano Superior, Deus, que permite que eu esteja rodeada pelo amor, compaixão e força que sempre sinto próximo a mim, e que em tantos momentos de quase desespero, foi Ele e os espíritos que me amam, que me ajudaram a continuar a caminhada me amparando em todo o percurso.

Infelizmente não tenho condições de, nominalmente agradecer às pessoas que foram vitais para a conclusão desse projeto, pois como já foi dito acima, são muitas, porém meus agradecimentos especiais vão para Milene, Rita, Robert, Prof. Luíz Carlos, Mônica, Edu, Gisele, Taborda, pela força, compreensão e ajuda em vários momentos no decorrer desses anos, principalmente durante a depressão.

Agradeço também aos amigos e colegas do laboratório e que eu conheci durante minha vida em São Paulo, tanto na USP, quanto no meu dia a dia.

Existem pessoas que simplesmente entram na sua vida para nunca mais sair dela, e sua simples existência traz plenitude e um senso de realização e compreensão de que certas coisas e pessoas não acontecem ou aparecem por acaso, há uma força muito maior que exige que certas coisas aconteçam, e é por isso que não posso deixar de agradecer à pessoas tão especiais para mim: Milene, José, Beta, Paulinha, Gisela, Rapha, Cris, Duds, Cirley.

Ao CouchSurfing que permitiu que eu conhecesse pessoas (e lugares) maravilhosas nesses últimos anos, e muitos se tornaram grandes amigos.

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



*“O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando. O caminho para ele não é encontrado, mas construído e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quanto o destino.”*

*ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY*

## RESUMO

**PEREIRA, G. S. A proteína ligadora de glutamato (GlnH) de *Streptococcus mutans* como alvo no desenvolvimento de estratégias vacinais de mucosa contra a cárie dental humana. 2018. 99 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.**

A cárie dental é uma doença infecciosa com ampla distribuição mundial que tem como principal agente etiológico o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*). Apesar dos esforços para desenvolvimento de uma vacina, não há disponível no mercado um produto para a utilização em humanos. O presente trabalho tem como objetivo o estudo de estratégias vacinais de mucosa utilizando novos alvos vacinais: a proteína GlnH e duas regiões da proteína P1 localizadas nas porções N-terminal e C-terminal, compreendendo as proteínas recombinantes P1<sub>39-512</sub> e P3C, respectivamente. A proteína GlnH é o componente ligante de glutamato/glutamina dos transportadores do tipo ABC, relacionada com a expressão de fatores associados à virulência. Os genes sintéticos, que codificam para a proteína GlnH completa (GlnHco) e dois fragmentos derivados dela: região N-terminal (nGlnH) e C-terminal (cGlnH), foram desenhados de forma a adaptar o uso de códons para a expressão em *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), e remoção do sítio de ligação ao substrato. Esses genes foram subclonados no vetor pHT08 e as proteínas, expressas pelas linhagens recombinantes de *B. subtilis*. Todas as proteínas apresentaram mobilidade alterada em gel de poliacrilamida, mesmo após serem submetidas a diferentes tratamentos com agentes desnaturantes/dissociativos. A ausência de alteração na mobilidade eletroforética após os tratamentos sugeriu que as proteínas se apresentavam como monômeros e que, possivelmente, o fenômeno seria decorrente da composição de aminoácidos das proteínas. Por fim, foi feita a purificação da proteína GlnHco e geração de soros policlonais para a utilização em ensaios de imunodeteção. Os anticorpos séricos gerados em camundongos imunizados com rGlnH interferiram na adesão de bactérias à cavidade bucal de camundongos não imunizados desafiados com *S. mutans*. Além disso, os camundongos ativamente imunizados com rGlnH foram parcialmente protegidos da colonização oral após o desafio com a cepa *S. mutans* NG8. Portanto, nossos resultados indicam que a proteína rGlnH de *S. mutans* é um potencial antígeno-alvo capaz de induzir respostas protetoras de anticorpos após administração sublingual. A P1 de *S. mutans* é a principal proteína envolvida na adesão bacteriana à superfície dental e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da cárie dentária. As duas regiões de ligação à saliva (SBR) têm sido estudadas como alvos vacinais, mas não a comparação ou

combinação entre elas. Neste estudo também avaliamos o potencial de uma abordagem vacinal baseada na administração intranasal e empregando as proteínas recombinantes P1<sub>39-512</sub> e P3C, isoladas ou em associação. Além disso, monitoramos pela imunoassinatura dos anticorpos gerados a resposta individual dos animais protegidos. Inicialmente, clonamos, expressamos e purificamos com sucesso a proteína P3C na linhagem recombinante de *B. subtilis*. A P3C recombinante preservou a região de ligação à saliva e, em associação com a P1<sub>39-512</sub>, não restaurou a estrutura tridimensional complexa que pode mascarar os epítomos inibidores de aderência importantes. Após a imunização intranasal, observamos níveis mais elevados de anticorpos antígeno-específicos quando na presença do adjuvante LTK63, quer com as proteínas isoladas ou em combinação. A coadministração das duas proteínas mostrou-se deletéria e reduziu os níveis de anticorpos gerados contra o sítio de ligação N-terminal, mas não contra o fragmento C-terminal. Respostas imunológicas protetoras foram observadas apenas em animais imunizados com a proteína P1<sub>39-512</sub>. Os animais imunizados com a proteína P3C tiveram um discreto aumento na colonização de *S. mutans* quando comparados ao grupo controle. Com a tecnologia de imunoassinatura, foi possível distinguir animais protegidos de animais não protegidos, mesmo entre animais do mesmo grupo. Ao final, aplicamos a assinatura protetora para identificar qual animal estaria protegido da colonização por *S. mutans*. Em resumo, demonstramos que o uso do sítio de ligação à saliva N-terminal tem maior potencial para proteger os animais contra colonização pelo patógeno oral *S. mutans*.

**Palavras-chave:** cárie dental, vacinas de subunidades, *Streptococcus mutans*, imunização, transportes ABC, proteína P1, imunoassinatura, adjuvante imunológico.

## ABSTRACT

PEREIRA, G. S. **The glutamate binding protein (GlnH) of *Streptococcus mutans* as a target in the development of mucosal vaccine strategies against human dental caries.** 2018. 99 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Dental caries is an infectious disease with a worldwide distribution and the main etiological agent is *Streptococcus mutans*. Despite efforts to develop a vaccine, a product for human use is not available on the market. The present study aims to study mucosal vaccine strategies using novel vaccine targets: the GlnH protein and two fragments of the P1 protein located at the N-terminal and C-terminal portions of the protein, comprising the recombinant proteins P1<sub>39-512</sub> and P3C, respectively. The GlnH protein is the glutamate/glutamine linker component of the ABC transporter related with the expression of bacterial virulence factors. The synthetic genes encoding the complete GlnH protein (GlnHco) and two fragments derived from it: the N-terminal (nGlnH) and C-terminal (cGlnH), were designed after adaptation of the codon usage for expression in *Bacillus subtilis* and removal of the substrate binding site. These genes were subcloned into the pHT08 vector and the proteins expressed by recombinant *B. subtilis* strains. All proteins showed altered mobility on polyacrylamide gel, even after treatment with denaturing/dissociative agents. The lack of altered electrophoretic mobility of after the treatments suggested that the proteins were monomers and the phenomenon would be ascribed to the amino acid composition of the proteins. Finally, the GlnHco protein was purified and polyclonal sera were prepared for use in immunodetection assays. Serum antibodies raised in mice immunized with rGlnH interfered in bacterial adhesion to the oral cavity of naïve mice challenged with *S. mutans*. Moreover, mice actively immunized with rGlnH were partially protected to oral colonization after challenge with the *S. mutans* NG8 strain. Therefore, our results indicate that *S. mutans* rGlnH is a potential target antigen capable to induce protective antibody responses after sublingual administration. The P1 of *S. mutans* is the main protein involved in the bacterial adhesion to the dental surface and, consequently, to the onset of the dental caries. The two saliva binding regions (SBR) have been previously studied as vaccine targets, but not when combined. In this study we evaluated the potential of an intranasal vaccine approach using the recombinant P1<sub>39-512</sub> and P3C proteins, individually or in association, to control *S. mutans* oral colonization. Additionally, we monitored the individual immunosignatures of antibodies raised in protected

animals. Initially, we successfully cloned, expressed, and purified P3C protein in recombinant strain *B. subtilis*. Recombinant P3C preserves saliva binding region and in mixed with P1<sub>39-512</sub> did not restore complex tridimensional structure which can mask important adherence-inhibiting epitopes. After the intranasal immunization, higher antibody levels were observed in the presence of the LTK63 adjuvant, either with each protein alone or in combination. Co-administration of both proteins proved to be deleterious and reduced the antibody levels to the N-terminal binding site but not for the C-terminal fragment. Protective immune responses were observed in animals immunized with P1<sub>39-512</sub>. Animals immunized with P3C protein had a slightly increased *S. mutans* colonization when compared to the mock group. With the immunosignature technology, we could discriminate protected animals from non-protected animals even in the same vaccinated group. At end, we applied the protective signature approach to identify which animal would be protected from *S. mutans* colonization. In summary, we have demonstrated that the use of the N-terminal saliva-binding site had greater potential to protect animals against colonization by the oral pathogen *S. mutans*.

**Key words:** dental caries, subunit vaccines, *Streptococcus mutans*, immunization, ABC transporters, P1 protein, immunosignature, immunologic adjuvant.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática dos fragmentos derivados da proteína P1 (NA-1, P1 <sub>39-512</sub> e P3C) .....	25
<b>Figura 2</b> - Organização típica de transportadores ABC em bactérias Gram-positivas .....	28
<b>Figura 3</b> - Demonstração das características identificadas <i>in silico</i> da proteína GlnH de <i>S. mutans</i> UA159 e modificações inseridas nos genes sintéticos .....	51
<b>Figura 4</b> - Sequência final de nucleotídeos sintetizados com sítios de restrição destacados...52	
<b>Figura 5</b> - Análise de restrição dos vetores de clonagem sintetizados pUC57GlnHco, pUC57nGlnH e pUC57cGlnH .....	53
<b>Figura 6</b> - Construção dos vetores de expressão de <i>B. subtilis</i> pHT08glnHco, pHT08nglnH e pHT08cglhH .....	54
<b>Figura 7</b> - Expressão da proteína GlnHco em linhagens recombinantes de <i>B. subtilis</i> .....	55
<b>Figura 8</b> - Expressão da proteína nGlnH (N-terminal) e cGlnH (C-terminal) em linhagens recombinantes de <i>B. subtilis</i> .....	56
<b>Figura 9</b> - SDS-PAGE dos extratos proteicos da linhagem recombinante de <i>B. subtilis</i> pHT08GlnHco #2 em diferentes condições de cultivo .....	57
<b>Figura 10</b> - Caracterização da proteína GlnHco e cGlnH após diferentes tratamentos desnaturantes .....	58
<b>Figura 11</b> - Caracterização da proteína GlnHco após tratamento com 6 M guanidina .....	60
<b>Figura 12</b> - Purificação da proteína recombinante GlnHco a partir de linhagem recombinante de <i>B. subtilis</i> .....	61
<b>Figura 13</b> - Respostas imunes específicas de GlnH após imunização sublingual .....	62
<b>Figura 14</b> - Avaliação funcional da atividade de anticorpos específicos de GlnH .....	64
<b>Figura 15</b> - Construção dos vetores de clonagem e de expressão contendo os fragmentos do gene <i>spaP</i> de <i>S. mutans</i> (P3C) .....	65
<b>Figura 16</b> - Expressão da proteína recombinante P3C em linhagem recombinante WB800 de <i>B. subtilis</i> .....	66
<b>Figura 17</b> - Purificação da proteína recombinante P3C a partir de linhagem recombinante de <i>B. subtilis</i> .....	67
<b>Figura 18</b> - Caracterização da proteína rP3C produzida na cepa de <i>B. subtilis</i> .....	68
<b>Figura 19</b> - Avaliação da resposta imunológica específica contra a proteína P1 <sub>39-512</sub> e P3C após imunização pela via intranasal de camundongos .....	69

<b>Figura 20</b> - Respostas imunes específicas de <i>S. mutans</i> P1 em camundongos imunizados via intranasal com fragmentos de proteínas P1 .....	72
<b>Figura 21</b> - Imunoassinatura de camundongos submetidos à imunização com proteínas recombinantes P3C ou P1 <sub>39-512</sub> por via intranasal .....	76
<b>Figura 22</b> - A imunoassinatura de IgG em matriz de peptídeos aleatórios utilizada para determinar a predição de epítipo entre cada grupo de vacina .....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Descrição das linhagens bacterianas de <i>S. mutans</i> , <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i> empregadas nesse trabalho .....	37
<b>Tabela 2</b> - Descrição dos plasmídeos usados e construídos nesse trabalho .....	38
<b>Tabela 3</b> – Descrição das características das proteínas recombinantes GlnHco e seus derivados .....	61



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC - *ATP Binding Cassete* (Cassete de ligação ao ATP)
- ATP - trifosfato de adenosina
- cglnH* – gene sintético que codifica para a porção C-terminal da proteína GlnH correspondendo ao aminoácido 125 a 270
- DES/RE – Desmineralização/remineralização
- DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)
- DO - densidade ótica
- ELISA - *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay* (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)
- GBPs - proteínas ligadoras de glucanos
- GlnH – proteína ligadora de glutamato
- glnH* – gene que codifica para a proteína ligadora de glutamato
- glnHco* – gene sintético que codifica para a proteína ligadora de glutamato
- Gp340 - glicoproteína 340
- Gtfs – Glicosiltransferases
- IgA - imunoglobulina A
- IgG - imunoglobulina G
- IgG1 - subclasse 1 da imunoglobulina G
- IgG2a - subclasse 2a da imunoglobulina G
- IPTG - Isopropyl  $\beta$ -D-1 thiogalactopyranoside (isopropil  $\beta$ -D-1 tiogalactopiranosideo)
- JCAT – programa de bioinformática para adaptação a sequências de procariotos
- kDa - quilodalton
- LB - Meio Luria-Bertani
- LS - ligador de substrato
- LT - toxina termo-lábil
- LTK4R - mutante de LT com substituição de uma lisina por uma arginina na posição 4 da subunidade A1
- LTK63 - mutante de LT com substituição de uma serina por uma lisina na posição 63 da subunidade A1
- M - molar
- MHC - *Major Histocompatibility Complex* (complexo principal de histocompatibilidade)
- ml – mililitro
- mM – milimolar

ng - nanograma

*nglnH* – gene sintético que codifica para a porção N-terminal da proteína GlnH correspondendo ao aminoácido 29 a 171

nm - nanômetro

NSD – *Non contagious disease* (doença não contagiosa)

OMS – Organização mundial da saúde

OppA - proteína ligadora de oligopeptídeos

PECs - Polissacarídeos extracelulares

pH - potencial hidrogeniônico

PiaA - componente ligador do transportador 2 de ferro de pneumococo

PiuA - componente ligador do transportador 1 de ferro de pneumococo

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

PstS - proteína ligadora de fosfato

rpm - rotações por minuto

rPstS - proteína PstS recombinante

SAG - *Salivary agglutinin* (aglutinina salivar)

SBR - *Saliva-Binding Region* (região de ligação à saliva)

SDS – *Sodium Dodecyl Sulphate- Polyacrilamide* (Dodecil sulfato de sódio)

WHO – *World health organization* (Organização mundial da saúde)

µg – micrograma

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1 Cárie dental humana - doença infecciosa multifatorial</b> .....	22
<b>1.2 <i>Streptococcus mutans</i> - principal agente etiológico da cárie dental</b> .....	22
<b>1.3 Estratégias de prevenção contra a cárie dental</b> .....	24
<b>1.3.1 Proteína de superfície P1 de <i>S. mutans</i> como antígeno vacinal</b> .....	24
<b>1.3.2 Sistemas de transporte ABC (<u>A</u>TP <u>B</u>inding <u>C</u>assete) como alvos vacinais</b> .....	27
<b>1.4 <i>Bacillus subtilis</i> – ferramenta biotecnológica</b> .....	30
<b>1.5 Vacinas via mucosa – nova estratégia potencial de imunização</b> .....	30
<b>1.6 Técnica de análise da imunoassinatura – para prever a eficácia vacinal</b> .....	32
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	34
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	34
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	34
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
<b>3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo</b> .....	36
<b>3.2 Clonagem e construção das linhagens recombinantes de <i>B. subtilis</i></b> .....	36
<b>3.2.1 Clonagem e construção das linhagens recombinantes de <i>B. subtilis</i> para o gene <i>glnH</i> e seus fragmentos</b> .....	36
<b>3.2.2 Clonagem e construção da linhagem recombinante de <i>B. subtilis</i> para a proteína P3C</b> .....	38
<b>3.3 Expressão da proteína GlnHco recombinante e seus fragmentos (nGlnH e cGlnH) e da proteína P3C recombinante</b> .....	39
<b>3.3.1 Teste de expressão em linhagens recombinantes de <i>B. subtilis</i></b> .....	39
<b>3.3.2 Determinação da condição de cultivo ideal para expressão das proteínas recombinantes derivadas da <i>GlnH</i></b> .....	40
<b>3.3.3 Fracionamento da cultura induzida de <i>B. subtilis</i></b> .....	40
<b>3.3.4 Imunodeteccção da proteína rGlnH e seus fragmentos</b> .....	40
<b>3.4 Purificação da proteína recombinante a partir de linhagens recombinantes de <i>B. subtilis</i> por cromatografia de afinidade</b> .....	41
<b>3.5 Expressão e purificação do antígeno P1<sub>39-512</sub></b> .....	41
<b>3.6 Regime vacinal</b> .....	42

3.6.1 Protocolo vacinal com a proteína GlnHco, coleta e processamento das amostras .....	42
3.6.2 Protocolo vacinal com a proteína P3C e P1 <sub>39-512</sub> , coleta e processamento das amostras .....	43
3.7 Avaliação da resposta imune .....	43
3.7.1 Avaliação da resposta imune GlnHco-específica .....	43
3.7.2 Imunodeteção da proteína GlnH nativa .....	44
3.7.3 Dot Blot para caracterização da proteína P3C recombinante produzida na cepa de <u>B. subtilis</u> .....	44
3.7.4 ELISA para detecção de adesão à saliva .....	45
3.7.5 ELISA para detecção de anticorpos IgG-específicos contra as proteínas P3C e P1 <sub>39-512</sub> .....	45
3.7.6 Reatividade de anticorpos com células inteiras de <u>S. mutans</u> NG8 por ELISA .....	45
3.8 Ensaio de soro-neutralização <i>in vivo</i> dos anticorpos GlnHco-específicos .....	46
3.9 Ensaio desafio <i>in vivo</i> .....	46
3.9.1 Funcionalidade dos anticorpos GlnHco-específicos .....	46
3.9.2 Funcionalidade dos anticorpos P3C-específicos .....	46
3.10 Análises estatísticas .....	47
3.10.1 Análises estatísticas para os dados da proteína recombinante GlnHco .....	47
3.10.2 Análises estatísticas para os dados da proteína recombinante P3C .....	47
3.11 Preparação e sondagem dos microarranjos com amostras de anticorpos .....	47
3.12 Análise dos dados de microarranjos peptídicos .....	48
3.13 Previsão de epítomos das seqüências de peptídeos selecionados .....	48
4 RESULTADOS .....	50
4.1 Resultados relacionados com a proteína GlnH .....	50
4.1.1 Construção dos vetores de expressão de <u>B. subtilis</u> contendo o gene completo da GlnH e seus fragmentos .....	50
4.1.2 Expressão da proteína GlnHco e seus fragmentos a partir de linhagens recombinantes de <u>B. subtilis</u> .....	54
4.1.3 Avaliação da migração diferencial das proteínas GlnHco e seus fragmentos em gel de SDS-PAGE .....	57
4.1.4 Purificação das proteínas recombinantes a partir de linhagens recombinantes de <u>B. subtilis</u> .....	61

<i>4.1.5 Imunogenicidade da proteína rGlnHco após administração pela via sublingual</i> .....	61
<i>4.1.6 Funcionalidade in vivo dos anticorpos rGlnHco-específicos</i> .....	62
<b>4.2 Resultados relacionados com a proteína P3C</b> .....	64
<i>4.2.1 Construção do vetor de expressão de <u>B. subtilis</u> contendo o gene que codifica para a P3C</i> .....	64
<i>4.2.2 Expressão e purificação da proteína recombinante P3C derivada da proteína P1 de <u>S. mutans</u></i> .....	65
<i>4.2.3 Caracterização da proteína P3C recombinante produzida na cepa de <u>B. subtilis</u></i> .....	67
<i>4.2.4 Resposta imune sistêmica após imunização intranasal com a proteína P3C e P1<sub>39-512</sub></i> .....	68
<i>4.2.5 Os anticorpos anti-P1<sub>39-512</sub> são capazes de proteger os camundongos contra a colonização oral por anticorpos de <u>S. mutans</u> mas não anti-P3C</i> .....	69
<i>4.2.6 A imunoassinatura IgG pode diferenciar animais com uma resposta protetora daqueles com uma resposta não protetora</i> .....	73
<i>4.2.7 A imunoassinatura protetora conhecida pode ser usada para prever a eficácia da vacina contra caries de animais individuais</i> .....	77
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	80
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	88
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	90

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Cárie dental humana – doença infecciosa multifatorial

A cárie dental é uma das doenças infecciosas que mais acometem os seres humanos (GUZMÁN-ARMSTRONG, 2005), classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos maiores problemas de saúde pública mundial, devido à sua alta prevalência (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015), e como a doença não contagiosa (NCD) mais comum no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Afeta quase 100% dos adultos na maioria dos países (PETERSEN *et al.*, 2005). Seu tratamento é dispendioso, podendo custar entre 5 e 10% dos orçamentos de saúde em países industrializados, excedendo os recursos financeiros disponíveis para o conjunto de cuidados de saúde para as crianças, na maioria dos países em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

O processo de adesão à superfície dental e formação de biofilme é imprescindível para o desenvolvimento dessa doença por permitir o contato inicial das diferentes espécies microbianas e seus produtos metabólicos ao dente (HAMADA; SLADE, 1980). Os microrganismos reconhecidos em lesões cariogênicas estão expostos a grandes quantidades de açúcar durante um período curto de tempo e alguns deles têm capacidade de utilizar estes hidratos de carbono para produzir ácido, sintetizar polissacarídeos extracelulares e armazenar energia (CCAHUANA-VÁSQUEZ; CURY, 2010). A produção de ácidos pelo biofilme dental após fermentação bacteriana, junto ao desequilíbrio do processo conhecido como DES/RE (processo de Desmineralização e Remineralização, sofrido pelos tecidos duros do dente, constantemente) dá origem ao processo de dissolução localizada resultando na cárie dental. Seu estabelecimento depende da associação do tempo com a suscetibilidade do hospedeiro, do substrato presente no meio e dos microrganismos no biofilme dental, sendo, portanto, considerada uma doença multifatorial (SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009).

Dentre os microrganismos do biofilme dental, o *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) é considerado a espécie mais cariogênica e predominante, em virtude de seus fatores de virulência que são os principais para o desenvolvimento da doença cárie, quais sejam: adesão, propriedades acidogênicas e acidúricas (LOESCHE, 1986).

### 1.2 *Streptococcus mutans* - principal agente etiológico da cárie dental

O *S. mutans* é uma bactéria gram-positiva, facultativa habitante da microbiota oral e considerada o principal agente etiológico da cárie dental (HAMADA; SLADE, 1980;

LOESCHE, 1986), além de estar sendo também correlacionado a doenças infecciosas não orais como a endocardite bacteriana (NOBBS; LAMONT; JENKINSON, 2009).

Os principais fatores de virulência associados ao *S. mutans* relacionados com a doença cárie são a sua capacidade de se aderir firmemente à superfície dental (adesão), metabolização de ácidos a partir dos carboidratos da dieta do hospedeiro (acidogenicidade) e resistência a pH ácidos (aciduricidade) (LOESCHE, 1986). Esses fatores estão diretamente ligados à patogenia do microrganismo, pois em primeira instância, participam ativamente na desmineralização da superfície dental pelo ácido láctico produzido e, em segunda, permitem a predominância desta bactéria nas regiões mais próximas das superfícies dentais, na qual o baixo pH é mais evidente (TAKAHASHI; NYVAD, 2011).

O processo de adesão é de vital importância para a patogênese da cárie dental em virtude de que, na sua ausência não haverá formação de biofilme e, conseqüentemente, desenvolvimento da doença. A aderência do *S. mutans* à superfície dental envolve dois estágios, sendo o primeiro deles sacarose-independente, que é reversível, mediado pela adesina bacteriana antígeno I/II (ou proteína P1) e o segundo, sacarose-dependente, irreversível (HAMADA; SLADE, 1980; TAUBMAN; NASH, 2006). O antígeno P1, expresso por todas as linhagens cariogênicas de *S. mutans* interage com as proteínas salivares da película adquirida, especialmente a gp340, que recobre o esmalte do dente, permitindo o início do processo de fixação. No segundo estágio ocorre a produção de glucanos insolúveis nomeados polissacarídeos extracelulares (PECs), que são produzidos pelas glicosiltransferases (Gtfs) a partir da sacarose oriunda da dieta do hospedeiro. A interação desses com as próprias Gtfs e proteínas ligadoras de glucanos (GBPs) presentes na superfície bacteriana permite o acúmulo de *S. mutans* e desenvolvimento do biofilme na superfície do dente (BANAS, 2004; BOWEN; KOO, 2011).

O *S. mutans* também possui vias glicolíticas completas para produção de ácidos, a partir de carboidratos, com velocidade superior aos outros estreptococos orais, conduzindo a uma mudança na composição microbiana da placa dental (acidogenicidade). Isto acarreta um aumento da proporção desta bactéria e de outras espécies acidogênicas e ácido tolerantes, ocasionando a manutenção do pH da placa baixo e propiciando a desmineralização do esmalte dental. Esse microrganismo consegue ainda, manter seu metabolismo nos baixos níveis de pH da placa dental (aciduricidade), diferentemente de outras espécies do gênero (BANAS, 2004).



### 1.3 Estratégias de prevenção contra a cárie dental

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a principal abordagem de saúde pública, com alta prioridade e urgência, se traduz na orientação de toda a população em reduzir o consumo de açúcares livres, visto que a cárie dental é o resultado da exposição ao longo da vida a esse fator de risco dietético. É importante que as estratégias de prevenção sejam universalmente disponíveis e acessíveis para toda a população incluindo o uso de flúor e cuidados de saúde oral, essenciais, centrados no paciente (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Entretanto, em virtude da importância e necessidade de diminuir a incidência da doença cárie, várias outras estratégias têm sido estudadas para sua prevenção, tendo como foco o seu principal agente etiológico, o *S. mutans*. No âmbito dessas estratégias, podemos destacar a vacinação, um método barato, de fácil distribuição, abrangência social e eficiente para o controle de doenças infecciosas. O conceito de vacinação contra cárie dental foi estabelecido pouco depois da determinação do papel desse agente etiológico no desenvolvimento da doença (LOESCHE, 1986; TAUBMAN; NASH, 2006).

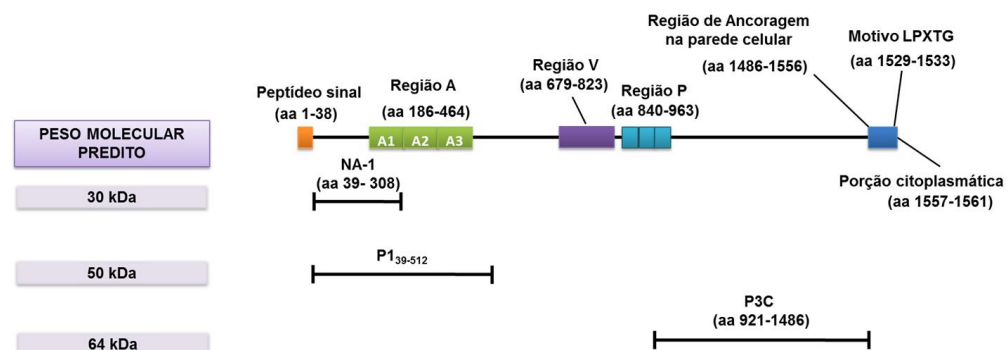
As primeiras pesquisas na formulação de vacinas para o controle da cárie empregaram a imunização do *S. mutans* completo pela via subcutânea com resultados encorajadores na redução expressiva da colonização oral pelo *S. mutans*. No entanto, com a possibilidade de geração de anticorpos com reatividade cruzada com fibras cardíacas humanas e de coelho, o interesse por essa abordagem tornou-se diminuído. Como resultado, houve um crescente interesse em estratégias de subunidade com proteínas e peptídeos derivados dos antígenos de superfície de *S. mutans*, principalmente contra a P1 (BOWEN, 1969; LEHNER; CHALLACOMBE; CALDWELL, 1980; RUSSELL, 1987; WU; RUSSELL, 1990; LEHNER, 1992; KOGA *et al.*, 2002).

#### 1.3.1 Proteína de superfície P1 de *S. mutans* como antígeno vacinal

A proteína P1, também denominada de Antígeno I/II ou Antígeno B (RUSSEL; LEHNER, 1978; KOGA *et al.*, 1995; JENKINSON; LAMONT, 1997) é a maior e principal proteína de superfície de *S. mutans*. A importância dessa proteína é devido ao seu enorme papel na adesão bacteriana à superfície dental por sua forte e complexa interação eletrostática com a aglutinina salivar humana (SAG ou glicoproteína 340 (gp340) adsorvida à película adquirida do dente. Anticorpos contra essa proteína bloqueiam a adesão rompendo com a colonização da cavidade oral pelo *S. mutans* (MA; LEHNER, 1990; MA *et al.*, 1998).

Desta forma, a proteína P1 tem mostrado ser um alvo promissor na imunidade protetora natural em humanos e tem sido estudada como um candidato em estudos de imunização ativa de primatas não humanos e murinos (LEHNER *et al.*, 1981; MICHALEK; KATZ; CHILDERS, 2001; SMITH; MATTOS-GRANER, 2008; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009). Dados atuais têm demonstrado que além da proteína P1 inteira, fragmentos derivados dela, principalmente seus domínios funcionais, são potenciais alvos em vacinas acelulares para o controle da cárie (SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009; BRADY *et al.*, 2010).

A P1 de *S. mutans* pode ser dividida em: região N-terminal que codifica para uma região rica em alanina (região A, resíduos de aminoácidos 186-464); região central com um segmento rico em prolina (região P, resíduos de aminoácidos 840-963); um segmento comumente referido como variável ou região V, entre as regiões A e P, onde reside a maior parte da diferença de sequência da proteína P1 de cepas de *S. mutans* (BRADY *et al.*, 1991); porção C-terminal, com o motivo LPXTG e uma cauda citoplasmática (FISCHETTI; PANCHOLI; SCHNEEWIND, 1990; TON-THAT MARRAFFINI; SCHNEEWIND, 2004) (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática dos fragmentos derivados da proteína P1 (NA-1, P1<sub>39-512</sub> e P3C). Organização estrutural da proteína P1 completa e regiões importantes destacadas. Peso molecular predito de cada derivado proteico da proteína P1 à esquerda. Fonte: Adaptado de HEIM *et al.*, 2014.

Em 2010 e 2011, a estrutura cristalográfica da proteína P1 de *S. mutans* foi resolvida e essa se mostrou única, com uma estrutura fibrilar alongada de aproximadamente 50 nm. A região A forma uma  $\alpha$ -hélice que entrelaça intimamente a região P em hélice, enquanto a região V se dobra formando uma estrutura globular (LARSON *et al.*, 2010; 2011). Dentre essas regiões, podemos destacar os domínios funcionais compreendidos na região A e na porção P e C-terminal, cada um contendo um dos dois sítios de ligação ao receptor salivar, a glicoproteína salivar (gp340) ou aglutinina salivar (*Salivary agglutinin* (SAG)), até agora descritos (HEIM; CROWLEY; BRADY, 2013; HEIM *et al.*, 2014) (Figura 1).

Com a recente resolução da estrutura tridimensional da P1 foi possível descobrir em detalhes o mecanismo básico da adesão bacteriana o que permitiu uma melhor compreensão dos estudos imunológicos. A interação da proteína P1 com SAG envolve dois sítios distintos de ligação localizados nos terminais N-terminal e C-terminal. O sítio de ligação N-terminal está situado na região rica em alanina ou região A e foi a primeira a ser descrita a conferir tropismo do *S. mutans* aos componentes salivares presentes na película adquirida, como a SAG, e, por essa razão, referida como região de ligação à saliva ou SBR (*Saliva-Binding Region*) (NAKAI *et al.*, 1993; PRAKOBPHOL *et al.*, 2000; TSUHA *et al.*, 2004). O segundo sítio de ligação, recentemente descrito, está localizado nos dois primeiros domínios principais do C-terminal: C1 e C2 (aminoácidos 992-1332) (LARSON, 2011; HEIM; CROWLEY; BRADY, 2013; HEIM *et al.*, 2014).

Reconhecendo que o foco principal das estratégias vacinais contra a cárie dental deveria ser a indução de anticorpos inibidores de aderência com habilidade de romper a adesão bacteriana ao dente, o uso de qualquer sítio de ligação SAG como antígeno alvo seria candidato consistente à vacina. Assim, proteínas recombinantes compreendendo a região A, tais como a proteína P1<sub>39-512</sub>, descrita pelo nosso grupo, produzida a partir de sistema de expressão de *B. subtilis* apresentou imunogenicidade e antigenicidade preservadas, confirmando o seu emprego em vacinas (TAVARES *et al.*, 2010). Além disso, o uso da proteína P1<sub>39-512</sub> como antígeno vacinal por via parenteral e de mucosa estimulou uma resposta humoral sistêmica e de mucosa elevada e foi capaz de bloquear a adesão de *S. mutans* à superfície abiótica, assim como os anticorpos foram capazes de neutralizar a adesão e colonização bacteriana à superfície dental de camundongos imunoprodutivos, demonstrando o potencial deste fragmento como antígeno em estratégias vacinais contra a cárie dental humana (BATISTA *et al.*, 2014a; BATISTA *et al.*, 2014b). Principalmente por suas propriedades antigênicas e imunogênicas, com a habilidade de induzir anticorpos protetores, tanto no soro como na saliva, que reduz a adesão do *S. mutans* e o desenvolvimento da cárie, essas proteínas recombinantes compreendendo a região A, tais como a proteína P1<sub>39-512</sub>, foram extensivamente exploradas por diferentes pesquisas de vacinas anti-cáries (SENPUKU *et al.*, 1996; HUANG *et al.* 2001; TSUHA *et al.*, 2004; TAVARES *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2014a; BATISTA *et al.*, 2014b). Contudo, trabalhos empregando outras porções da proteína P1 têm mostrado que a proteção não está restrita a essa região SBR (RHODIN *et al.*, 2004; McARTHUR *et al.*, 2007; SHI *et al.*, 2012).

De fato, dentre esses domínios funcionais e estruturais também podemos destacar regiões compreendidas na porção C-terminal da proteína P1, que apresenta o segundo sítio de

ligação ao receptor salivar, contido no fragmento denominado de P3C (que compreende a terceira repetição de prolina da região P (P3) até o final da proteína) que é mascarado na proteína nativa pela região denominada de NA-1, porção N-terminal (HEIM; CROWLEY; BRADY, 2013; HEIM *et al.*, 2014) (**Figura 1**). Tem sido relatado que C1/C2 compõem a maioria da capacidade aderente do terminal C de P1 (LARSON, 2011) e o terminal N de P1 interage intimamente e fortemente com ambos C1 e C2. A proximidade deste local com a interface C1/C2 provavelmente explica porque o terminal N não só contribui para a estabilidade do pedículo helicoidal alongado de P1, mas também aumenta a aderência do terminal C à aglutinina salivar quando NA1 e P3C interagem para formar um complexo, já que várias moléculas de glicose foram encontradas dentro da estrutura C-terminal primitiva, que se acredita representar um domínio de ligação ao açúcar e local de interação com gp340 (HEIM; CROWLEY; BRADY, 2013).

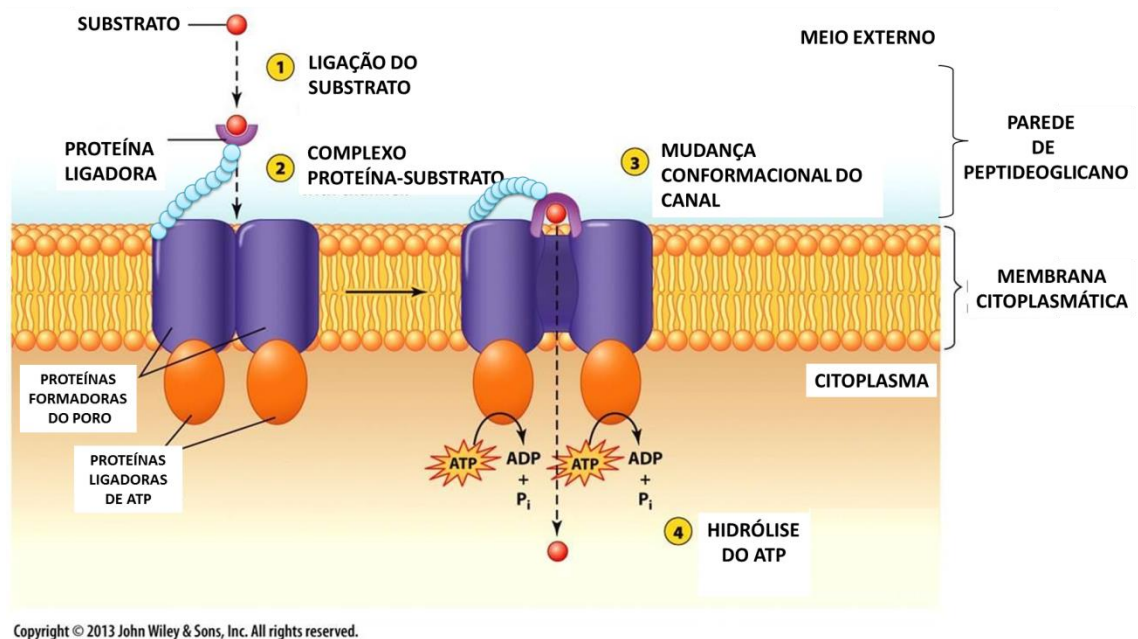
Um número menor de estudos usou o sítio de ligação SAG C-terminal como antígeno, no entanto, foi demonstrado o potencial de neutralização *in vitro* superior desses anticorpos comparado com aqueles criados contra a proteína P1 de comprimento total (HEIM; CROWLEY; BRADY, 2013; ROBINETTE *et al.*, 2014). Assim, em estudo realizado por Robinette *et al.*, em 2014, foi demonstrado que estratégias vacinais, utilizando o fragmento P3C da proteína P1 como alvo, foram capazes de induzir anticorpos com maior capacidade de inibição da adesão bacteriana *in vitro* em comparação com a proteína recombinante P1 completa, o que indica a possibilidade de se efetuar estudos utilizando este sítio com resultados promissores.

Outra direção, que está sendo tomada pelas pesquisas converge para os transportadores bacterianos da família dos ABC (ATP Binding Cassete) que têm sido caracterizados como potenciais alvos devido ao importante papel que desempenham na fisiologia e virulência de microrganismos patogênicos (GARMORY; TITBALL, 2004).

### ***1.3.2 Sistemas de transporte ABC (ATP Binding Cassete) como alvos vacinais***

Para metabolizar substâncias essenciais à sua sobrevivência o microrganismo precisa ter a capacidade de captar e ou expelir essas substâncias. Sistemas de transporte são primordiais 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 (HIGGINS, 1992; 2001).

Os sistemas do tipo ABC em bactérias são constituídos por três componentes funcionais e estruturais. Dois desses componentes apresentam-se associados à membrana citoplasmática sendo responsáveis pela geração de energia para o sistema e para o poro através do qual as substâncias serão transportadas. O terceiro, e último, está envolvido com a ligação ao substrato, também chamado de ligador de substrato (LS) sendo responsável pela especificidade e afinidade do sistema, mostra-se solúvel nas bactérias gram-negativas, ou associado à membrana citoplasmática e exposto na superfície das bactérias gram-positivas, como no caso dos *S. mutans* (DASSA, 2000) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Organização típica de transportadores ABC em bactérias Gram-positivas. A proteína ligadora interage especificamente com o substrato, formando o complexo proteína ligadora-substrato. As proteínas transmembrânicas formam o canal pelo qual o substrato será transportado para dentro da célula. O componente citoplasmático é responsável por se ligar e hidrolisar ATP fornecendo energia para que o transporte ocorra. Fonte: Adaptado de *Microbiology & Molecular Biology 2610 with Feldman at University of Connecticut*.

Em 2002, o genoma da cepa UA159 de *S. mutans* foi sequenciado na Universidade de Oklahoma e disponibilizado no GeneBank (NC 004350). Foram encontrados cerca de 280 genes (15% do total de regiões de leitura) codificadores de sistemas de transporte (AJDÍC *et al.*, 2002). Os sistemas de transporte ativos da família ABC são os mais abundantes com mais de 60 transportadores, ou seja, 10% do número total de regiões de leitura da espécie. Até o momento, os estudos dos transportadores ABC de *S. mutans* se limitaram aos transportadores de açúcar, metais, oligopeptídeos e aminoácidos (NEPOMUCENO *et al.*, 2007).

Devido ao importante papel na fisiologia e virulência bacteriana, transportadores ABC vêm sendo investigados como possíveis alvos vacinais. Por meio de triagens com soros de animais ou pacientes infectados, observou-se elevada reatividade com diferentes componentes

de sistemas ABC, sobretudo os componentes ligantes de substrato. Dentre esses, destacam-se sistemas de transporte de *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus* nos quais os componentes ligantes estão expostos na superfície da célula (GARMORY; TITBALL, 2004). Esses resultados apontam para um possível papel dos ABC transportadores como alvos para imunoterapias e/ou profilaxia.

Algumas abordagens vacinais utilizando componentes de sistemas ABC de transporte foram testadas em modelos animais como a proteína PstS de *Mycobacterium tuberculosis* e de *S. mutans*, relacionada com o transporte de fosfato, as proteínas PiuA e PiaA de *S. pneumoniae*, envolvidas na captação de ferro e a proteína OppA de *Y. pestis* e *Moraxella catarrhalis* capazes de transportar uma variedade de peptídeos (TANGHE *et al.*, 1999; TANABE *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2016). Esses estudos demonstram que, além de imunogênicas essas proteínas podem promover proteção vacinal em modelos experimentais de infecção.

Bactérias gram-positivas, principalmente as do gênero *Streptococcus*, apresentam um transportador ativo para glutamato e glutamina, como observado em *S. lactis* e o *S. cremoris* (POOLMAN; SMID; KONINGS, 1987). A captação de glutamina em *S. mutans* é estimulada por íons potássio e está intimamente ligada ao valor de pH intracelular. Recentemente buscou-se esclarecer os aspectos moleculares do transporte desse aminoácido em *S. mutans* e seu papel na fisiologia bacteriana, focando-se na análise do sistema codificado pelo óperon *gln*, predito como o transportador responsável pela captação de glutamina (AJDÍC *et al.*, 2002; KRASTEL *et al.*, 2010). Entretanto, os dados obtidos demonstraram que, diferentemente da predição *in silico*, esse óperon codifica um sistema de transporte ativo específico para captação de glutamato.

O aminoácido glutamato, em conjunto com a glutamina, possui papel central no metabolismo bacteriano. Esses aminoácidos são importantes fontes de nitrogênio e necessários para o crescimento em condições limitantes de amônia, conseqüentemente, são importantes para síntese de outros aminoácidos, ácidos nucleicos, açúcares aminados e muitas outras moléculas biológicas. A glutamina é a amida do ácido glutâmico (glutamato) e representa um verdadeiro sensor de disponibilidade de nitrogênio extracelular além de modular a taxa de replicação celular. Por outro lado, a concentração intracelular de glutamato responde a variações de osmolaridade do meio e representa o principal grupamento aniônico responsável pela manutenção dos níveis de K<sup>+</sup> no interior das células. Além disso, a inibição de glutamato pode levar a desestruturação e fragilização da parede bacteriana. Em *S. mutans*, foi demonstrado que a deleção do óperon *gln* afetou a tolerância ao ambiente ácido

(aciduricidade), um fator de virulência importante para o desenvolvimento da doença, sugerindo que esse pode ser um possível alvo em estratégias vacinais para controle da cárie dental humana (KRASTEL *et al.*, 2010).

#### **1.4 *Bacillus subtilis* – ferramenta biotecnológica**

O *B. subtilis* é uma bactéria gram positiva, formadora de esporos com longa história de aplicação na produção de proteases e comida fermentada. Esse microrganismo apresenta características peculiares que o destaca como ferramenta biotecnológica, como: i) a formação de esporos, que facilita sua estocagem e transporte; ii) ausência de membrana externa e, portanto, de contaminação com LPS; iii) um grande conhecimento de sua genética e fisiologia; iv) diferentes sistemas de expressão; v) a sua segurança para uso em humanos. Atualmente, seu uso é amplo e seu papel como sistema alternativo de expressão de proteínas heterólogas e veículo de entrega em vacinas de mucosa já é reconhecido (HARWOOD, 1992; PAULITZ; BÉLANGER, 2001; FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005).

Como sistema de expressão e purificação de proteínas heterólogas, o *B. subtilis* é uma alternativa em potencial aos modelos procariotos convencionais baseados em *Escherichia coli*, isto porque é capaz de produzir moléculas com atividade biológica preservada e em grandes quantidades, sem a contaminação por endotoxinas (HARWOOD, 1992; MEIMA; VAN DIJL; BRON, 2004; WESTERS; WESTERS; QUAX, 2004). Um grande número de vetores está disponível, e esses empregam os mais diferentes promotores e direcionamento das proteínas heterólogas para compartimentos diferentes, intra ou extracelular (PHAN; NGUYEN; SCHUMANN, 2006; PACCEZ *et al.*, 2007; KAKESHITA *et al.*, 2011; TROESCHEL *et al.*, 2012). Nosso grupo já demonstrou o potencial do *B. subtilis* como sistema de expressão para antígenos vacinais de *S. mutans* (TAVARES *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2014a; BATISTA *et al.*, 2014b). Um peptídeo derivado da proteína P1 foi expresso em altas concentrações em *B. subtilis*, acima dos níveis produzidos em *Escherichia coli* (*E. coli*) e ainda apresentou características antigênicas e imunogênicas preservadas (McARTHUR *et al.*, 2007; TAVARES *et al.*, 2010).

#### **1.5 Vacinas via mucosa – nova estratégia potencial de imunização**

A natureza da resposta imunológica tem relação direta com a via de imunização e tem havido um crescente interesse em vacinas de administração mucosa em função de serem alternativas seguras, não necessitarem de dispositivos especiais de entrega nem pessoal de saúde treinado resultando em maior aceitabilidade pela população (PARK, *et al.*, 2012). No

entanto, o uso de veículos vacinais com estabilidade térmica e resistência aos estresses induzidos quando da passagem pelas vias de mucosa são indispensáveis motivando o uso de esporos de *B. subtilis*. Dentre as vias de mucosa utilizadas com o *B. subtilis* como veículo vacinal, podemos destacar as vias: oral, nasal e ultimamente, a sublingual (AMUGUNI; TZIPORI, 2012).

A administração de vacinas via nasal tem a capacidade de induzir respostas sistêmicas e de mucosa, superiores à administração via oral, com menores números de doses e menor concentração do antígeno. Usando como veículo vacinal esporos recombinantes de *B. subtilis* expressando o antígeno em sua superfície, por essa via de imunização, foram obtidos resultados similares e, em muitos casos, superiores aos conseguidos com a via oral, além da produção de altos títulos de IgG séricos e IgA em mucosas, indicando a possibilidade de redução da quantidade de esporos usados e melhoria do protocolo vacinal (DUC *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2010a; LEE *et al.*, 2010b). No entanto, alguns estudos têm questionado esta via em virtude de que, os resultados dos trabalhos têm demonstrado que os antígenos inalados ou os adjuvantes coadministrados podem percorrer um caminho retrógrado pelo bulbo olfativo e causar efeitos colaterais pondo em risco a segurança desta via (ARMSTRONG *et al.*, 2005).

A via sublingual tem recebido pouca atenção até recentemente, mas estudos atualizados têm documentado a segurança e efetividade da imunização sublingual demonstrando sua capacidade de induzir respostas imunes sistêmicas e de mucosa contra uma gama de antígenos, incluindo proteínas solúveis, antígenos inter particulados e vírus suprimidos. Além disso, os antígenos não sofrem com a degradação por enzimas e são rapidamente absorvidos (SHIM *et al.*, 2013). Trabalhos fazendo uso de esporos de *B. subtilis* demonstraram a capacidade desta via na indução de anticorpos sistêmicos e de mucosa protetores contra a toxina tetânica em camundongos e leitões (AMUGUNI *et al.*, 2011; AMUGUNI; TZIPORI, 2012).

Embora muitas questões relacionadas com a imunização sublingual permaneçam ainda discutíveis no que se refere à utilização de adjuvantes adequados e otimização da formulação para obtenção de uma eficácia maior da vacina, estudos têm demonstrado ser a imunização sublingual segura e altamente eficaz na geração de respostas imunes contra o antígeno administrado. A via sublingual demonstrou também conferir imunidade protetora estimulando simultaneamente IgG sistêmica e anticorpos IgA de mucosa, sendo considerada uma nova mas promissora via de administração de vacinas (SHIM *et al.*, 2013).

A imunização sublingual mostrou-se segura e efetiva para indução da resposta imune protetora em compartimentos mucosos e sistêmicos estimulando células imunes em mucosa e



órgãos linfoides sistêmicos com proteção comparável à induzida pela imunização intranasal e associada com altos níveis de anticorpos vírus-específicos (PARK, *et al.*, 2012).

Mais recentemente, pesquisas desenvolvidas com o objetivo de produzir vacinas para prevenir a cárie dental avaliaram a indução de respostas de anticorpos em camundongos após imunização sublingual com uma formulação contendo a proteína recombinante rPstS e um adjuvante derivado da toxina termolábil das cepas de *E. coli* enterotoxigênica. Os camundongos imunizados exibiram respostas sistêmicas medidas pelo número de células secretoras de imunoglobulina A na drenagem de nódulos linfáticos. Os anticorpos séricos criados em camundongos imunizados com rPstS interferiram na adesão de bactérias à cavidade bucal de camundongos virgens desafiados com *S. mutans*. Da mesma forma, os camundongos ativamente imunizados com rPstS foram parcialmente protegidos da colonização oral após o desafio com a cepa *S. mutans* NG8 (FERREIRA *et al.*, 2016).

### **1.6 Técnica de análise da imunoassinatura – para prever a eficácia vacinal**

Mais do que a intensidade, a especificidade fina e as diferenças sutis da resposta imune entre as estratégias vacinais podem ser determinantes para o resultado da interação do patógeno ao hospedeiro. Para entender essa fina sintonia da resposta imune, uma ferramenta poderosa é a tecnologia de imunoassinatura, que é baseada em microarranjos de peptídeos contendo sequências não naturais randomizadas, permitindo o uso desta plataforma para qualquer pesquisa sobre vacina e doença (LEGUTKI *et al.*, 2010; CHASE; JOHNSTON; LEGUTKI, 2012; STAFFORD *et al.*, 2012; LEGUTKI; JOHNSTON, 2013; SYKES; LEGUTKI; STAFFORD, 2013; STAFFORD *et al.*, 2014; CHAPOVAL *et al.*, 2015; O'DONNELL *et al.*, 2015).

Usando imunoassinatura é possível desvendar a complexidade de resposta imune humoral e prever a eficácia da vacina, como já demonstrado para a vacina contra influenza, bem como diagnosticar com precisão várias doenças de uma só vez (LEGUTKI *et al.*, 2010; HALPERIN *et al.*, 2012; HUGHES *et al.*, 2012; KUKREJA; JOHNSTON; STAFFORD 2012; STAFFORD *et al.*, 2012; RESTREPO; STAFFORD; JOHNSTON, 2013; JOHNSTON; THAMM; LEGUTKI, 2014).

Dessa forma, o estudo de novos alvos vacinais como o fragmento P3C e a proteína GlnH produzidos em sistemas de expressão mais favoráveis como o *B. subtilis* pode resultar em novas estratégias vacinais mais promissoras para o controle da cárie dental humana causada por *S. mutans*.

## **2 OBJETIVOS**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo principal do presente trabalho foi desenvolver e caracterizar estratégias vacinais de subunidades administradas por via de mucosa contra a cárie dental humana, empregando como alvo vacinal três proteínas recombinantes, produzidas em linhagens recombinantes de *B. subtilis*, derivadas da proteína ligadora de glutamato (GlnH) e dois fragmentos da proteína P1, correspondentes a regiões de ligação à aglutininas salivares, de *S. mutans*.

### 2.2 Objetivos específicos

I- avaliar a indução da imunidade protetora à colonização de *S. mutans* após imunização de camundongos com formulações vacinais contendo formas recombinantes da proteína de ligação glutamina/glutamato (GlnH) por via sublingual e em combinação com um adjuvante de mucosa derivado da toxina termo-lábil (LT). Vale ressaltar que empregamos três fragmentos de proteína derivados da proteína GlnH, a porção N-terminal (resíduos de aminoácidos 1 até 143), a porção C-terminal (resíduos de aminoácidos 144 até 242) e a proteína completa com a finalidade de avaliar qual fragmento seria o melhor antígeno vacinal;

II- avaliar a imunogenicidade das estratégias vacinais por via de mucosa (nasal) usando duas porções envolvidas com a ligação à aglutinina salivares da proteína P1, correspondendo à porção N-terminal, representada pela P1<sub>39-512</sub>, e a porção C-terminal (P3C) da região P, expressas em linhagem recombinante de *B. subtilis*, coadministradas ou não com um adjuvante, e, comparar a funcionalidade dos anticorpos produzidos, no controle de colonização oral por *S. mutans* em camundongos;

III- usar a tecnologia de determinação de imunoassinatura de anticorpos para determinar a eficácia de estratégias vacinais para o controle de cárie dental humana causada por *S. mutans*.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

As linhagens e vetores utilizados neste trabalho estão descritos na **tabela 1**. As técnicas pertinentes à transformação e seleção dos clones recombinantes tanto em *Escherichia coli* quanto em *Bacillus subtilis* seguiram os procedimentos padrões descritos na literatura (ANAGNOSTOPOULOS; SPIZIZEN, 1961; XUE, JOHNSON; DALRYMPLE, 1999; SAMBROOK; RUSSEL, 2001). As cepas de *Streptococcus mutans* UA159 e NG8 foram cultivadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) com 0,3 % de extrato de levedura (BHY) ou *Toddy Hewitt Broth* com 0,3 % de extrato de levedura (ToddY) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, e tanto *E. coli* como *B. subtilis* foram crescidos em meio Luria-Bertani (LB) a 37°C sob agitação constante por 16 horas. Quando necessário foram adicionados antibióticos nas respectivas concentrações: ampicilina (100 µg/ml) para o crescimento da linhagem de *E. coli* DH5α e cloranfenicol (30 µg/ml) para as linhagens de *B. subtilis* 1012 e WB800.

#### 3.2 Clonagem e construção das linhagens recombinantes de *B. subtilis*

##### 3.2.1 Clonagem e construção das linhagens recombinantes de *B. subtilis* para o gene *glnH* e seus fragmentos

Os fragmentos derivados do gene *glnH* (*glnHco*, *nglnH* e *cglnH*) foram sintetizados pela empresa GenScript® a partir da sequência gênica da linhagem UA159 de *S. mutans*. Esses fragmentos tiveram seu códon adaptado para a expressão em sistema de *B. subtilis* usando o programa JCAT (<http://www.jcat.de/>), assim como o possível sítio de ligação ao glutamato modificado (aminoácidos 144 e 145) (segundo observações descritas por SUN *et al.*, 1998), e sem o peptídeo sinal. Para a expressão da proteína recombinante GlnH completa (*GlnHco*) e suas porções em *B. subtilis*, os fragmentos de gene foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I a partir dos vetores de clonagem construídos pela empresa GenScript® (*pUC57glnHco*; *pUC57cglnH*; *pUC57nglnH*) e os insertos obtidos foram subclonados no vetor *pHT08* (NGUYEN; PHAN; SCHUMANN, 2007). Os DNAs plasmidiais dos clones foram extraídos conforme descrito por Sambrook *et al.*, 2001, e analisados em gel de agarose 0,8%. Os DNAs plasmidiais foram clivados com a enzima de restrição *Bam*HI e *Xba*I e depois foram novamente analisados em gel de agarose 0,8%. Os vetores de expressão construídos foram denominados de *pHT08GlnHco*, *pHT08cGlnH* e *pHT08nGlnH*, (**Tabela 2**).

**Tabela 1.** Descrição das linhagens bacterianas de *S. mutans*, *E. coli* e *B. subtilis* empregadas nesse trabalho.

<b>LINHAGENS BACTERIANAS</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>FONTE</b>
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR, recA1 endA1 hsdR17(rk- mk+ phoA supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1	Invitrogen
<b><i>B. subtilis</i></b>		
1012	<i>leuA8 metB5 trpC2 hsrdRM1</i>	Wehrl; Niederweis; Schumann, 2000
WB800	Linhagem de <i>B. subtilis</i> 1012 com 7 proteases deletadas;	Murashima, 2002
LDV701	1012 transformada com o vetor pLDV701 (P1 <sub>39-512</sub> sobre o controle do promotor Pgrac).	Tavares <i>et al.</i> , 2010
<i>B. subtilis</i> pHT08GlnHco	Linhagem 1012 de <i>B. subtilis</i> transformada com o vetor de expressão pHT08GlnHco que permite produção da proteína completa com a cauda de histidina N-terminal;	Este trabalho
<i>B. subtilis</i> pHT08cGlnH	Linhagem 1012 de <i>B. subtilis</i> transformada com o vetor de expressão pHT08cGlnH que permite produção da porção C-terminal da proteína GlnH com a cauda de histidina (N-terminal);	Este trabalho
<i>B. subtilis</i> pHT08nGlnH	Linhagem 1012 de <i>B. subtilis</i> transformada com o vetor de expressão pHT08nGlnH que permite produção da porção N-terminal da proteína GlnH com a cauda de histidina (N-terminal);	Este trabalho
HT08P3C	Linhagem 1012 de <i>B. subtilis</i> transformada com o vetor de expressão pHT08P3C que permite produção da porção C-terminal da proteína P1 com a cauda de histidina (N-terminal);	Este trabalho
<b><i>S. mutans</i></b>		
UA159	Cepa sequenciada na universidade de Oklahoma	AJDIC <i>et al.</i> (2002)
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 2.** Descrição dos plasmídeos usados e construídos nesse trabalho.

Plasmídeos	DESCRIÇÃO	FONTE
pUC57	Vetor plasmidial de clonagem para <i>E. coli.</i> ; tamanho molecular 2710 pb	GeneScript
pHT08	Amp <sup>R</sup> ; Cm <sup>R</sup> ; Promotor induzível por IPTG (Pgrac); His-tag N-terminal	MoBiTec
pCR2.1 - pTOPO	Vetor de clonagem para <i>E. coli.</i> ; tamanho molecular 3931 pb.	Invitrogen ®
pHT08GlnHco	Vetor de expressão pHT08 contendo o gene <i>glnHco</i> clonado (gene <i>glnH</i> completo)	Este trabalho
pHT08nGlnH	Vetor de expressão pHT08 contendo o gene <i>nglnH</i> clonado (porção N-terminal da proteína GlnH)	Este trabalho
pHT08cGlnH	Vetor de expressão pHT08 contendo o gene <i>cglnH</i> clonado (porção C-terminal da proteína GlnH)	Este trabalho
pMP3C	Vetor de clonagem pCR2.1-TOPO contendo o gene <i>spaPP3C</i> clonado	Este trabalho
pHT08P3C	Vetor de expressão pHT08 contendo o gene <i>spaPP3C</i> clonado	Este trabalho

### 3.2.2 Clonagem e construção da linhagem recombinante de *B. subtilis* para a proteína P3C

A amplificação do fragmento do gene *spaP* (*spaPP3C*) de *S. mutans* NG8 foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) com iniciadores específicos para P3C (P3CFw 5'-CGCCATGGATCCATGAATAAACCCACACCGCCGACC-3', sítio de restrição sublinhado (*Bam*HI); e Reverse 5' GGCCATGACGTCTTATTATGAACTGTAAGTTACCCATTGACAGT-3', sítio de restrição sublinhado (*Aat*II)), enzima Taq DNA polimerase e ciclo térmico (92°C – 2 min; 94°C – 2 min; 56°C – 1 min; 7°C – 2 min; repetição 29 vezes (passo 2 - 4); 72°C – 20 min). O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0,8% e a banda correspondente ao gene foi purificada com kit illustra™ (GE Healthcare).

O fragmento obtido e purificado foi ligado ao vetor pCR2.1-TOPO®, seguindo instruções do fabricante. A mistura de ligação foi transformada em *E. coli* DH5 $\alpha$  competente, por choque térmico. O produto de transformação foi plaqueado em meio Luria-Bertani (LB) com ampicilina (100  $\mu$ g/ml), e Blue-gal. Após incubação à 37°C por uma noite, selecionamos as colônias de cor branca e inoculamos em meio seletivo LB com ampicilina (100  $\mu$ g/ml). O DNA plasmidial do clone foi extraído conforme descrito por Sambrook *et. al.*, 2001 e analisado em gel de agarose 0,8%. O DNA plasmidial foi clivado com a enzima de restrição

*EcoRI* e depois foi novamente analisado em gel de agarose 0,8%. O vetor de clonagem construído foi denominado de pMP3C, (**Tabela 2**).

Depois de confirmada a correta inserção do gene de interesse, passamos à etapa de subclonagem no vetor de expressão pHT08 de *B. subtilis*. Nesta etapa, clivamos o vetor construído com as enzimas de restrição *BamHI* e *AatII*, assim como o vetor de expressão pLDV701, previamente construído no laboratório (TAVARES *et al.*, 2010). Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% e os fragmentos correspondentes ao vetor pHT08 digerido e ao inserto foram excisados do gel e purificados pelo mesmo método descrito acima. Com esse material purificado e quantificado fizemos as reações de ligação empregando a T4 DNA Ligase (ThermoScientific®) em reação contendo: 60 ng de vetor, 17 ng de inserto, 1 µl de T4 DNA ligase, 1 µl de tampão de ligação e q.s.p. água milli-Q para um volume final de 10 µl. A mistura de ligação foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas e depois transformada em células DH5α competentes. Os clones resistentes à ampicilina (100 µg/ml) foram isolados, crescidos em meio LB seletivo e o DNA plasmidial foi extraído. Para a confirmação da subclonagem o DNA plasmidial foi digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *AatII* e analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%. O vetor construído foi denominado de pHP3C.

### **3.3 Expressão da proteína GlnHco recombinante e seus fragmentos (nGlnH e cGlnH) e da proteína P3C recombinante**

#### **3.3.1 Teste de expressão em linhagens recombinantes de *B. subtilis***

O ensaio de expressão das proteínas recombinantes e fragmentos foram realizados na linhagem de *B. subtilis* 1012 (**Tabela 1**). Após eletrotransformação (XUE; JOHNSON; DALRYMPLE, 1999) com os vetores construídos pHT08GlnHco, pHT08cGlnH, pHT08nGlnH e pHTP3C, as bactérias foram crescidas por 16 horas em meio LB suplementado com cloranfenicol (30 µg/ml). Em seguida, foi realizado o inóculo das linhagens recombinantes (1:100) em 50 ml de meio LB, contendo 15 µg/ml de cloranfenicol, e estes foram mantidos a 37°C sob agitação (200 rpm) até DO<sub>600nm</sub> de 0.6 – 0.8, quando se acrescentou à cultura o indutor IPTG (isopropil-b-D-galactosídeo) 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, T0), após 2 horas de incubação (cultura induzida, T2), após 4 horas de incubação (T4) e após 16 horas de incubação (T16). 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- $\beta$ -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 Brilliant* R250 conforme descrito por Sambrook e Russell (2001).

### **3.3.2 Determinação da condição de cultivo ideal para expressão das proteínas recombinantes derivadas da *GlnH***

Para a avaliação de diferentes condições de cultivo, as linhagens recombinantes de *B. subtilis* foram crescidas em meio LB suplementado com cloranfenicol (15  $\mu$ g/ml) em 4 condições diferentes durante a indução com IPTG: a) 37°C, por 2 horas em 200 rpm; b) 18°C, por 2 horas em 200 rpm; c) 4°C, 16 horas sem agitação ; d) 37°C por 2 horas sem agitação. Amostras de cada condição foram separadas e preparadas como descrito anteriormente.

### **3.3.3 Fracionamento da cultura induzida de *B. subtilis***

Os extratos bacterianos induzidos foram ressuspensos em 1/10 do volume inicial da cultura em tampão Tris-HCl (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5) e lisozima (50  $\mu$ g/ml), seguido de incubação em gelo por 1 hora. Após esse período foi adicionado 0,1% SDS e 1 mM PMSF (fenilmetanosulfonilfluorido), e as suspensões foram sonicadas por 3,5 minutos, com pulso ativo de 30 segundos e pausa de 1 minuto, com amplitude mínima de 35% por 3 vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (1 hora, 8.000 rpm, 4°C), o precipitado foi separado do sobrenadante e estes foram denominados de extrato insolúvel (I) e solúvel (S), respectivamente. Amostras dos extratos solúvel e insolúvel foram preparadas com tampão de amostra, fervidas por 10 minutos, e analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%). A concentração de proteínas foi determinada usando gel SDS-PAGE 12,5% para quantificação proteica, com albumina bovina sérica (BSA (Bovine serum albumin, ~66kDa)) como padrão.

### **3.3.4 Imunodeteção da proteína *rGlnH* e seus fragmentos e da proteína *P3C***

A confirmação da expressão da proteínas recombinantes 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>2</sub> para *GlnH* e fragmentos e T<sub>4</sub> para *P3C*) 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).

### **3.4 Purificação das proteínas recombinantes a partir de linhagens recombinantes de *B. subtilis* por cromatografia de afinidade**

Para a purificação das proteínas recombinantes realizou-se ensaios de cromatografia de afinidade usando resinas niqueladas (His Trap 5mL, GE®), em função da ligação específica da cauda de histidina a esse metal de transição. O processo de purificação automatizado foi feito em aparelho AKTA – FPLC (Pharmacia), segundo instruções do fabricante. A eluição da proteína foi realizada pelo aumento gradual da concentração de imidazol (5 mM, 10 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM e 1 M). As frações eluídas foram analisadas em gel de poliacrilamida. As proteínas purificadas foram quantificadas por meio de gel SDS-PAGE 12,5% utilizando BSA como padrão.

### **3.5 Expressão e purificação do antígeno P1<sub>39-512</sub>**

O antígeno vacinal P1<sub>39-512</sub> foi purificado a partir da linhagem LDV701 de *B. subtilis* conforme descrito por Tavares *et al.*, 2010. Uma alíquota-estoque da linhagem LDV701, cultivada em meio LB contendo cloranfenicol (30 µg/mL) foi mantida sob agitação (200 rpm) a 37 °C por 16 horas. Essa cultura, referida como pré-inóculo, foi cultivada na proporção de 1/100 diluída em 1 litro de meio LB, incubada a 37 °C sob agitação (200 rpm) até corresponder à densidade ótica (DO<sub>600nm</sub>) de 0,6-08. Em seguida, a expressão da proteína foi induzida com a adição do indutor Isopropil β-D-tiogalactosídeo (IPTG – Sigma) na concentração final de 1 mM. A cultura foi mantida sob as mesmas condições anteriormente descritas por até 4 horas e centrifugada a 10.000 rpm a 4 °C por 10 minutos. As células sedimentadas foram ressuspensas em 100 ml de tampão A (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5) ao que foi adicionado lisozima (50 µg/ml) mantido em gelo por 1 hora.

Posteriormente, foi adicionada uma solução inibidora de protease contendo sulfato de dodecil de sódio (SDS) na concentração final de 0,01% acrescida de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) 0,01 M. A seguir, foi realizada a lise mecânica sob alta pressão (600 psi em 15 minutos) em homogeneizador modelo APLAB-10 (ARTEPEÇAS. Brasil). O material lisado foi clarificado por centrifugação (10.000 rpm por 1 hora a 4°C) e o sobrenadante (fração solúvel) separado do precipitado (insolúvel) e filtrado com membrana com poros 0,22 µm. Então, a fração solúvel contendo a proteína P1<sub>39-512</sub> foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel em coluna His Trap HP 5 mL (GE, Healthcare). O processo de purificação foi realizado em aparelho AKTA – FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) automatizado, conforme instruções do fabricante. Primeiramente, a coluna foi equilibrada com 5 volumes de coluna (vc) de tampão A com fluxo correspondente de 1,0 mL/minuto. O extrato solúvel da linhagem LDV701 foi aplicado à coluna junto com 50 mM de Imidazol. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 10 vc de tampão A, e iniciou-se a eluição das proteínas adsorvidas à coluna com diferentes concentrações de Imidazol (100 mM, 500 mM e 1M) em tampão B (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 M de Imidazol pH 7,5). As amostras das frações eluídas que correspondiam aos picos, visto no cromatograma, foram desnaturadas a 100°C por 5 minutos, e aplicadas em gel de poliacrilamida 12,5%. A seguir, as amostras correspondentes ao pico da proteína P1<sub>39-512</sub> foram reunidas, e transferidas para a membrana de diálise (ThermoScientific, #88244) ficando por um período de 6 horas em tampão A para retirada de Imidazol. A proteína P1<sub>39-512</sub> foi então quantificada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12,5% utilizando curva padrão de (BSA) (Pierce™) proteína do soro bovino. A proteína purificada foi confirmada por ensaio de *Western Blot* seguido por imunodeteção utilizando anticorpos específicos para cauda de histidina (*anti-HisTag*).

### **3.6 Regime vacinal**

#### ***3.6.1 Protocolo vacinal com a proteína GlnHco, coleta e processamento das amostras***

Todos os animais envolvidos no experimento foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética para uso de animais em laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (nº protocolo CEUA: 69/2014).

Camundongos da linhagem BALB/c fêmeas, entre 6 a 8 semanas de idade, foram adquiridos no Biotério de Isogênicos da Parasitologia-ICBII/USP. Os animais foram mantidos segundo as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CO BEA).

Os camundongos foram imunizados pela via sublingual em um regime de 3 doses, com intervalo de duas semanas, 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 (n=5) de animais recebeu 5 µg da proteína rGlnH pura ou em combinação com 5 µg de LTK63, 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 a 4°C e o sobrenadante separado e mantido a -20 °C. O ensaio foi repetido duas vezes de forma independente.

### ***3.6.2 Protocolo vacinal com a proteína P3C e P1<sub>39-512</sub>, coleta e processamento das amostras***

Para imunização intranasal, grupos de 4 animais, com 6-8 semanas de idade, foram inoculados com um volume máximo de 10 µl (por narina) com a proteína P3C e/ou P1<sub>39-512</sub> (5 µg/dose) sozinhas ou coadministradas com o adjuvante LTK63 (5 µg/dose) nos dias 1, 10 e 20. Amostras de soro foram recolhidas um dia antes da administração da primeira dose (amostras pré-ímmunes) e no dia anterior à nova dose. O sangue foi coletado por punção submandibular, mantido a temperatura ambiente por 30 minutos, depois incubado a 4°C por mais 30 minutos e, por fim, centrifugado (5.000 rpm, 30 minutos a 4°C) e o soro foi separado. Todas as amostras foram armazenadas a - 80°C. O ensaio foi repetido duas vezes de forma independente.

## **3.7 Avaliação da resposta imune**

### ***3.7.1 Avaliação da resposta imune GlnHco-específica***

Os níveis de anticorpos humorais foram determinados, em animais imunizados, por ensaio de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), mas usando apenas a proteína rGlnHco intacta como antígeno ligante. No ensaio de ELISA utilizando amostra de soro de cada grupo imunizado em pool, microplacas de poliestireno Maxisorp (Nunc®) foram sensibilizadas por 16 h a 4 °C com a proteína rGlnHco (200 ng/poço). 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 pool foi adicionado aos poços. Primeiro diluído em 1:50 e depois 1:2 até 1:3200. As placas foram então 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, para medir IgG específica de GlnHco total, e anti-IgG1 e anti-IgG2a para medir as subclasses. 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 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. A absorbância foi mensurada a 492 nm em leitora de placa (LabSystem). Os valores da absorbância do grupo PBS foram subtraídos dos grupos vacinados e a concentração dos anticorpos antígenos-específicos foram determinados por uma curva padrão com concentrações conhecidas de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a de camundongo (Southern Biotech®). Todas as amostras foram testadas em duplicata. O valor da absorbância do soro pré-imune foi usado como branco. As curvas de diluição foram feitas para cada amostra e os títulos foram calculados como logaritmos da maior diluição com densidade óptica superior a 0.05.

### **3.7.2 Imunodeteção da proteína GlnH nativa**

A imunodeteção da GlnH nativa na cepa NG8 de *S. mutans* foi avaliada por ELISA como descrito previamente (TAVARES *et al.*, 2010).

### **3.7.3 Dot Blot para caracterização da proteína P3C recombinante produzida na cepa de B. subtilis.**

A formação de complexos de fragmentos N-terminal e C-terminal foi avaliada por imunoenensaio em *Dot Blot*. As proteínas purificadas P3C e P1<sub>39-512</sub> (400 ng) isoladas ou previamente misturadas foram aplicadas à membrana de nitrocelulose e incubadas com monoclonos mAb 4-10A, mAb 6-8C e mAb 3-8D. Para a imunodeteção, as amostras das proteínas isoladas ou previamente misturadas foram aplicadas numa concentração de 2 µg e nas formas solúvel e desnaturada por fervura (100 °C por 10 minutos) diretamente. O bloqueio e as incubações foram realizados conforme descrito. As reações foram reveladas utilizando o kit quimioluminescente (Super Signal™, Pierce), conforme descrito pelo fabricante, em fotodocumentador ChemiDoc™ MP (Bio-Rad).

### **3.7.4 ELISA para detecção de adesão à saliva**

A capacidade da proteína P3C recombinante produzida em *B. subtilis* aderir à saliva humana foi avaliada por ensaio de ELISA e titulação em placas de 96 poços MaxiSorp (Nunc) recobertas com a proteína recombinante P3C, P1<sub>39-512</sub> ou P1 (200 ng/poço) de acordo com o protocolo descrito por Tavares *et al.*, 2010. A concentração dos anticorpos antígenos-específicos foram determinados por uma curva padrão com concentrações conhecidas de anticorpos IgG de camundongo (Southern Biotech®). Como controle negativo, utilizamos a albumina de soro bovino purificada (BSA). Os resultados representam dois ensaios realizados de forma independente.

### **3.7.5 ELISA para detecção de anticorpos IgG-específicos contra as proteínas P3C e P1<sub>39-512</sub>**

O nível de anticorpos específicos total (IgG total e subclasses) nos soros dos animais imunizados foram determinados por ensaio de ELISA e titulação em placas de 96 poços MaxiSorp (Nunc) recobertas com a proteína recombinante P3C ou P1<sub>39-512</sub> de acordo com o protocolo descrito por Tavares *et al.*, 2010. Os valores da absorbância do grupo PBS foram subtraídos dos grupos vacinados e a concentração dos anticorpos antígenos-específicos foram determinados por uma curva padrão com concentrações conhecidas de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a de camundongo (Southern Biotech®).

### **3.7.6 Reatividade de anticorpos com células inteiras de *S. mutans* NG8 por ELISA**

Placas de ELISA foram revestidas com  $1 \times 10^8$  UFC de *S. mutans* NG8 pré lavadas com PBS 1X em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). As reações foram realizadas utilizando anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase seguido por desenvolvimento com dicloridrato *O*-fenilenodiamina 0,1 M (OPD, Sigma Aldrich) e 0,012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluído em tampão citrato de fosfato (0,01 M). As reações foram paradas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M e a absorvância a 492 nm, medida num leitor de placas ELISA (Multiskan EX; ThermoLabsystems, Finlândia). Todas as amostras foram analisadas em duplicata. 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 com 2 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e a absorbância foi mensurada a 492 nm em leitora de placa de ELISA (Multiskan EX; ThermoLabsystems, Finland). Todas as amostras foram avaliadas em duplicata.

### **3.8 Ensaio de soro-neutralização *in vivo* dos anticorpos GlnHco-específicos**

As atividades dos anticorpos contra a colonização dental *in vivo* foram testadas em camundongos de acordo com o protocolo descrito por Batista *et al.* (2014b). 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, os animais foram anestesiados e 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 (MS) 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.

### **3.9 Ensaio desafio *in vivo***

#### **3.9.1 Funcionalidade dos anticorpos GlnHco-específicos**

A funcionalidade dos anticorpos GlnHco-específicos foi também avaliada por desafio de colonização oral contra camundongos imunizados aplicando o protocolo de colonização oral descrito acima (e descrito por TAVARES *et al.*, 2010) em animais submetidos ao protocolo de imunização sublingual, duas semanas após a última dose. Após seguir as etapas anteriores antes da inoculação oral, as células NG8 de *S. mutans* não foram pré-incubadas com anticorpos, mas aplicadas diretamente no dente de camundongo imunizado. Os animais inoculados com PBS foram utilizados como controle negativo. Da mesma forma, amostras orais foram coletadas e incubadas em placas de ágar MS e, em seguida, as UFCs recuperadas foram contadas.

#### **3.9.2 Funcionalidade dos anticorpos P3C-específicos**

Para o desafio *in vivo*, três semanas após a última dose, os animais imunizados foram tratados como descrito acima (TAVARES *et al.*, 2010) e inoculados com as bactérias *S. mutans* NG8 preparadas, mas sem incubação com quaisquer anticorpos. A coleta de material seguiu também o protocolo descrito por Tavares *et al.*, 2010.

### 3.10 Análises estatísticas

#### 3.10.1 Análises estatísticas para os dados da proteína recombinante *GlnHco*

Os resultados foram analisados com o programa GRAPHPAD PRISM 5 (GraphPad Software Inc, LA Jolla, CA) e foram expressos como a média  $\pm$  SEM. Diferenças estatisticamente significantes foram analisadas com one-way ANOVA e teste *Bonferroni post*, sendo considerada significância estatística entre os grupos experimentais quando  $p < 0.05$ .

#### 3.10.2 Análises estatísticas para os dados da proteína recombinante *P3C*

Os resultados foram analisados com o programa GRAPHPAD PRISM 5 e foram expressos como a média  $\pm$  SD. Diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0.05$ ) foram determinadas pelo teste de *Student's t* e *Mann-Whitney post*.

### 3.11 Preparação e sondagem dos microarranjos com amostras de anticorpos

Os microarranjos de peptídeos foram fabricados usando a síntese *in situ* de 10.000 (CIM10K) sequências de peptídeos não naturais e randomizados. Os arranjos de peptídeos foram impressos como descrito anteriormente (CHASE; JOHNSTON; LEGUTKI, 2012) e armazenados a 4°C com dessecação numa atmosfera de argônio. O excesso de peptídeo que não foi conjugado com a superfície do arranjo foi removido por lavagem durante 5 minutos em tampão de lavagem orgânica (33% de isopropanol, 7,33% de acetonitrilo, e 0,55% de ácido trifluoroacético), seguido de 30 minutos de lavagem em solução salina tamponada com Tris (19,98 mM Tris, 136 mM NaCl, pH 7,4) com 0,05% Tween-20 (TBST) e 3X de 30 imersões em H<sub>2</sub>O bidestilada, e secou-se por centrifugação (800 rpm, 5 min). Em seguida, as lâminas foram incubadas com 250  $\mu$ l de tampão de bloqueio (1XPBS, 3% BSA, 0,05% Tween-20, 0,014% de mercaptohexanol) em câmara úmida e mantidos em rotação lenta por uma hora a 37°C. Depois, os arranjos foram lavados e secos como descrito anteriormente e incubados com soros diluídos (1:250) em tampão PBST (1X PBS, 3% BSA, 0,05% Tween-20) na câmara de umidade sob rotação lenta por uma hora a 37°C. Após lavagem e secagem, os arranjos foram incubados com 5 nm de anti-IgG de camundongo ou anti-IgA de camundongo (Alexa Fluor 647-rotulado (vermelho) ou Alexa Fluor 555-rotulado (verde)), seguido por 1 hora de incubação a 37°C. Lavagens finais em TBST e água destilada foram feitas para remover o sal residual. As lâminas foram secas por centrifugação. No final, os arranjos foram lavados e secos como descrito e foram escaneados a 533 nm usando um *array scanner* Innoscan 910 (Innopsys, Carbonne, França) (RESTREPO; STAFFORD; JOHNSTON, 2013; JOHNSTON; THAMM; LEGUTKI, 2014).



### 3.12 Análise dos dados de microarranjos peptídicos

As análises estatísticas dos dados de microarranjos de peptídeos foram feitas usando o software JMP 12 (Statistical Discovery Software da SAS) importando análise de dados do Excel e dados processados por imagem do GenePix Pro-6.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). As intensidades brutas foram normalizadas para cada lâmina dividindo todos os valores por arranjo pela mediana desse arranjo (normalização mediana). Manchas de baixa qualidade foram excluídas da análise por sinalização como “ausente” por inspeção visual. Os efeitos do lote foram minimizados usando o algoritmo de combinação de lotes (ComBat) (KUKREJA; JOHNSTON; STAFFORD, 2012). Valores inferiores a 0,01 foram ajustados para 0,01 e valores de arranjos duplicados foram calculados e utilizados na análise. Peptídeos importantes foram determinados pelo teste *Student two-tailed t* com correção de *Benjamani and Hochberg multiple test* aplicados a um valor de  $p < 0,05$  (RESTREPO; STAFFORD; JOHNSTON, 2013; JOHNSTON; THAMM; LEGUTKI, 2014) Para o diagrama de venn, usamos o website: [http://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate\\_venn.html](http://bioinformatics.psb.ugent.be/cgi-bin/liste/Venn/calculate_venn.html). Para a análise de componentes principais, utilizamos os peptídeos significativos para cada abordagem e análise de vacina, usando o software JMP 12.

### 3.13 Previsão de epítomos das seqüências de peptídeos selecionados

Listas de peptídeos informativos foram comparadas com as seqüências da proteína P1<sub>39-512</sub> ou P3C usando o GuiTope (HALPERIN, *et al.*, 2012). A matriz de substituição de aminoácidos foi fornecida por cada biblioteca de peptídeos e seqüência proteica. Um peso de inversão de 1 foi selecionado. Escores subtraídos da biblioteca foram retornados usando a média de 10 amostragens aleatórias da biblioteca de peptídeos e um ponto de corte mínimo de 8,0. Os resultados foram representados graficamente usando o GRAPHPAD PRISM 5 usando uma média móvel de 15.

## **4 RESULTADOS**

## 4 RESULTADOS

Com a finalidade de facilitar o entendimento dos resultados de cada antígeno alvo os dados obtidos foram descritos separadamente.

### 4.1 Resultados relacionados com a proteína GlnH

#### 4.1.1 Construção dos vetores de expressão de *B. subtilis* contendo o gene completo da GlnH e seus fragmentos

Nosso grupo, em estudos prévios, tentou produzir a proteína GlnH de *S. mutans* em sistemas de expressão de *E. coli* e de *B. subtilis*, contudo problemas no cultivo das culturas, que demoravam para se replicar e não atingiam absorvâncias elevadas, resultavam em baixa expressão da proteína recombinante. Nossa hipótese era que, mesmo uma pequena quantidade de proteína recombinante estava se ligando ao substrato glutamato/glutamina dentro da célula e impedindo seu crescimento adequado limitando a expressão da proteína. Então, para superar esses problemas decidimos sintetizar os genes codificantes para a proteína GlnH completa com duas principais modificações: primeiro, substituímos as duas histidinas (HH) nas posições 144/145 por duas argininas (RR) no sítio de ligação ao substrato; segundo, adaptamos o códon para expressão em *B. subtilis* por JCAT *software*, reduzindo assim a interferência desse com o metabolismo bacteriano e indução de maiores níveis da proteína de interesse. Ainda, decidimos por construir dois fragmentos da proteína GlnH, visando avaliar, futuramente, o potencial desses como alvo vacinal frente a proteína inteira.

Assim, iniciamos essa etapa com a caracterização *in silico* da proteína GlnH de *S. mutans* UA159 determinando o possível sítio de interação com os aminoácidos glutamato/glutamina e propriedades imunológicas como as potenciais regiões antigênicas e peptídeos reconhecidos pelo MHC (*Major Histocompatibility Complex*) de classe II. Como pode ser visto na **figura 3**, o sítio de ligação à glutamina/glutamato é composto por duas histidinas (H) ladeadas que interagem com o resíduo de aminoácido lisina (K), todos marcados em vermelho. Além disso, podemos observar que as regiões antigênicas em potencial estão distribuídas ao longo de toda a proteína não havendo predileção por uma porção ou outra, assim como os peptídeos que podem ser reconhecidos pelo MHC II.

RR

MNIKKFLI
SLAALIMIATSLSGLSKVNA
DNVTSPQVKKI
KRAGVLKVGVKQ
DVPNFGYYNA  
ETGKYEGMEIDI
ARKIAKSI
IGVKLELVPVTT
QTREPLMDNGQVDLVIATY
FITPERQASYS  
ISK
PYYDQIGFLVRQSSKISKI
SDL
DGLTIGV
SQGATT
KVNLEAYAKK
HH
LKFNYVQLGS  
FP
ELAISLYSKRIDAF
SVDKSI
LTGYVSKQSKLLKS
GFNTQEYGIATKKSNTGL
TKYVNYL  
LKK
WTADKSLESIYNKHNLESAK
PDK

- - Peptídeo sinal
- - Sítio de ligação
- - Porções antigênicas
- Peptídeo MHC II (sublinhado)
- RR - Troca

**Figura 3.** Demonstração das características identificadas *in silico* da proteína GlnH de *S. mutans* UA159 e modificações inseridas nos genes sintéticos.

A sequência de aminoácidos da proteína GlnH foi analisada usando ferramentas de bioinformática como: SignalP, para a identificação do peptídeo sinal; EMBOSS: antigenic – Bioinformatics, para as regiões antigênicas; T Cell Epitopes - MHC Binding Prediction, para os peptídeos reconhecidos pelo MHC II. O sítio de ligação ao substrato foi identificado baseado em referências bibliográficas que caracterizaram a GlnH de *E. coli*.

Com base nessas informações, decidimos desenhar três diferentes genes sintéticos para serem avaliados como antígenos vacinais: i) gene *glnHco*: sequência codificante para a proteína GlnH completa retirando apenas o peptídeo sinal e o sítio de ligação ao substrato, por meio da troca das duas histidinas por duas argininas (R); ii) gene *nglnH*: sequência que codifica para a porção N-terminal da proteína GlnH, correspondendo ao aminoácido 29 até o 171; iii) gene *cglnH*: sequência que codifica para a porção C-terminal da proteína GlnH, correspondendo ao aminoácido 125 até o 270. Todos os fragmentos do gene *glnH* não apresentam o peptídeo sinal e o sítio de ligação ao substrato, quando presente, foi modificado, assim como tiveram seu *codon usage* adaptado para expressão em *B. subtilis* usando o programa JCAT. A sequência de nucleotídeos final de cada gene construído e sintetizado está descrita na **figura 4** e os sítios de clonagem inseridos (*BamHI* e *XbaI*) estão destacados.

***glnHco* (GlnHco)**

**ggatcc**ATGGATAACGTTACATCTCCTCAAGTTAAAAAATCAAACGTGCTGGCGTTCTTAAAGTTGGCGTTAAACAAGATGTTCCTAACTTCGGCTACTACAACGCTGAAACAGGCAAATACGAAGGCATGGAAATCGATATCGCTCGTAAAATCGCTAAATCTATCGGCGTTAAACTTGAACCTTGTTCCTGTTACAACACAAAACACGTGAACCTCTTATGGATAACGGCCAAGTTGATCTTGTTATCGCTACATACACAATCACACCTGAACGTCGAAGCTTCTTACTCTATCTCTAAACCTTACTACTACGATCAAATCGGCTTCCTTGTTTCGTCGAATCTTCTAAAATCTCTAAAATCTCTGATCTTGATGGCCTTACAATCGGCGTTTCTCAAGGCGCTACAACAAAAGTTAACCTTGAAGCTTACGCTAAAAACGTCGTCTTAAATCACTACGTTCAACTTGGCTCTTCCCTGAACTTGCTATCTCTTTACTCTAAACGATATCGATGCTTTCTCTGTTGATAAATCTATCCTTACAGGCTACGTTCTAAACAATCTAAACCTCTAAATCTGGCTTCAACACACAAGAATACGGCATCGCTACAAAAAATCTAACACAGGCCTTACAAAATACGTTAACTACCTTCTTAAAAATGGACAGCTGATAAATCTTGAATCTATCTACAACAAAACATAACCTTGAATCTGCTAAACCTGATAAATA**ctaga**

***nglnH* (nGlnH – N-terminal)**

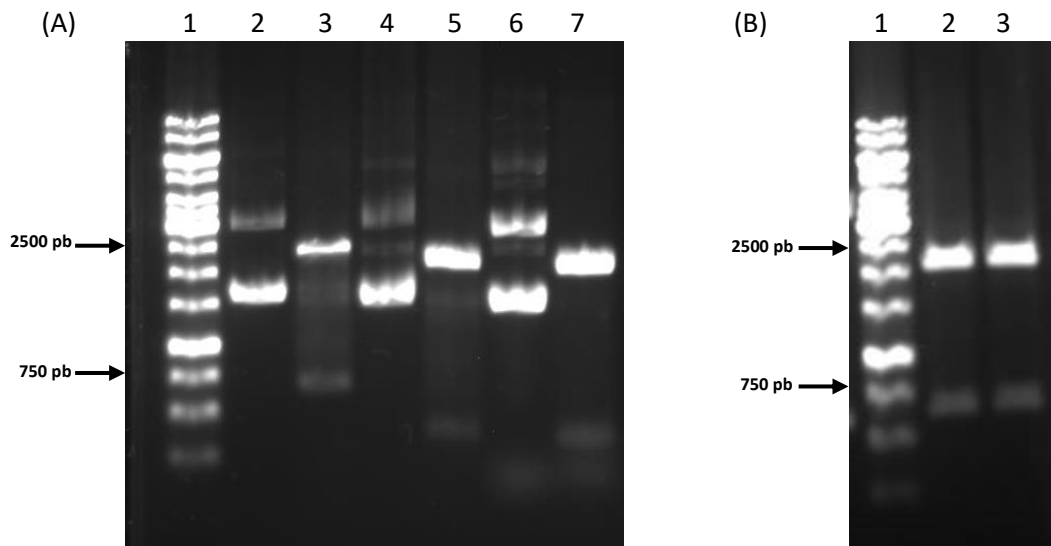
**ggatcc**ATGGATAACGTTACATCTCCTCAAGTTAAAAAATCAAACGTGCTGGCGTTCTTAAAGTTGGCGTTAAACAAGATGTTCCTAACTTCGGCTACTACAACGCTGAAACAGGCAAATACGAAGGCATGGAAATCGATATCGCTCGTAAAATCGCTAAATCTATCGGCGTTAAACTTGAACCTTGTTCCTGTTACAACACAAAACACGTGAACCTCTTATGGATAACGGCCAAGTTGATCTTGTTATCGCTACATACACAATCACACCTGAACGTCGAAGCTTCTTACTCTATCTCTAAACCTTACTACTACGATCAAATCGGCTTCCTTGTTTCGTCGAATCTTCTAAAATCTCTAAAATCTCTGATCTTGATGGCCTTACAATCGGCGTTTCTCAAGGCGCTACAACAAAAGTTAACCTTGAAGCTTACGCTAAAAAATA**ctaga**

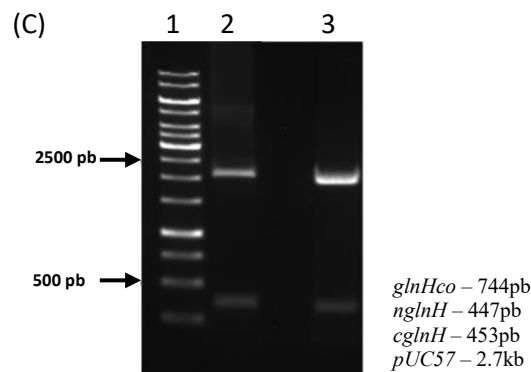
***cglnH* (cGlnH - C-terminal)**

**ggatcc**ATGCCTTACTACTACGATCAAATCGGCTTCCTGTTTCGTCGAATCTTCTAAAATCTCTAAAATCTCTGATCTTGATGGCCTTACAATCGGCGTTTCTCAAGGCGCTACAACAAAAGTTAACCTTGAAGCTTACGCTAAAAACGTCGTCTTAAATTCAACTACGTTCAACTTGGCTCTTCCCTGAACCTTGCTATCTCTCTTTACTCTAAACGATCGATGCTTTCTCTGTTGATAAATCTATCTTACAGGCTACGTTTCTAAACAATCTAAACTTCTTAAATCTGGCTTCAACACACAAGAATACGGCATCGCTACAAAAAATCTAACACAGGCCTTACAAAATACGTTAACTACCTTCTTAAAAAATGGACAGCTGATAAATCTCTTGAATCTATCTACAACAAAACATAACCTTGAATCTGCTAAACCTGATAAATA**ctaga**

**Figura 4.** Sequência final de nucleotídeos sintetizados com os sítios de restrição destacados (*Bam*HI - a jusante; *Xba*I – a montante do gene).

Com os vetores de clonagem pUC57*glnHco*, pUC57*nglnH* e pUC57*cglnH* sintetizados, realizamos a análise de restrição com as enzimas *Bam*HI e *Xba*I para verificar a presença dos genes alvos. Após a digestão com as enzimas de interesse todos os vetores de clonagem liberaram dois fragmentos, um deles com tamanho molecular aproximado de 2.7 kb, correspondendo ao vetor pUC57, e outros de 744 pb, 447 pb e 453 pb, correspondendo aos genes de interesse *glnHco*, *nglnH* e *cglnH*, respectivamente, confirmando que os vetores sintetizados estavam de acordo com o planejado (**Figuras 5 A, B e C**).

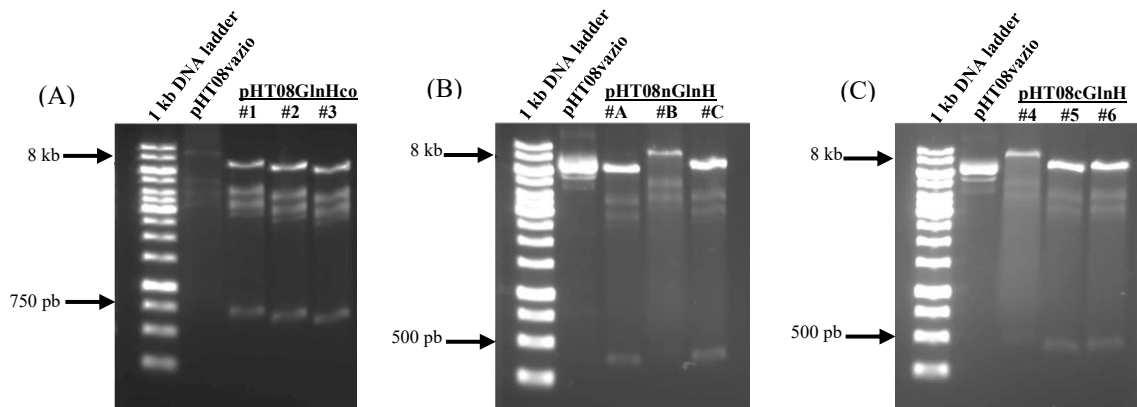




**Figura 5.** Análise de restrição dos vetores de clonagem sintetizados pUC57GlnHco, pUC57nGlnH e pUC57cGlnH. (A) Digestão do vetor pUC57glnHco. Amostras: 1 – O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 2 – pUC57glnHco não digerido; 3 – pUC57glnHco digerido; 4 – pUC57nglnH não digerido; 5 – pUC57nglnH digerido; 6 – pUC57cglH não digerido; 7 – pUC57cglH digerido. (B) Digestão do vetor pUC57glnHco. Amostras: 1 – O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 2 – pUC57glnHco digerido; 3 – pUC57glnHco digerido. (C) Digestão do vetor pUC57nglnH e pUC57cglH. Amostras: 1 – O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder; 2 – pUC57nglnH digerido; 3 – pUC57cglH digerido.

Em seguida, os vetores de clonagem e o vetor final de expressão, pHT08, foram digeridos com as enzimas de restrição *BamHI* e *XbaI*. Os fragmentos de DNA correspondendo aos insertos, assim como, o vetor digerido foram purificados e ligados para a construção dos vetores de expressão em *B. subtilis*. A **figura 6** demonstra a análise de restrição dos possíveis clones recombinantes para os vetores pHT08GlnHco, pHT08nGlnH e pHT08cGlnH. Os fragmentos correspondentes aos genes *glnHco*, *nglnH* e *cglH* foram liberados do vetor pUC57glnHco, pUC57nglnH e pUC57cglH, respectivamente, através de digestão com as enzimas de restrição *BamHI* e *XbaI*, purificados e inseridos no vetor pHT08 através de reação de ligação. O DNA plasmidial dos possíveis clones recombinantes foram digeridos para verificar a presença dos genes de interesse.

Observamos que todos os clones recombinantes #1, #2 e #3 do vetor pHT08GlnHco apresentam duas bandas correspondendo ao vetor pHT08 (8 kb) e o inserto *glnHco* (744 pb), confirmando a construção do vetor de expressão para o gene completo da proteína GlnH. No caso dos fragmentos da *glnH*, apenas os clones #A e #C do vetor pHT08nGlnH e #5 e #6 do pHT08cGlnH, foram positivos, confirmado pela presença das duas bandas, a primeira respectiva ao vetor pHT08 e a segunda ao inserto (447 pb e 453 pb, respectivamente). Desta forma, selecionamos os clones recombinantes #1, #A e #5 para cada vetor (pHT08GlnHco, pHT08nGlnH e pHT08cGlnH). A construção dos genes sintéticos também foi confirmada por sequenciamento automatizado (dados não mostrados).

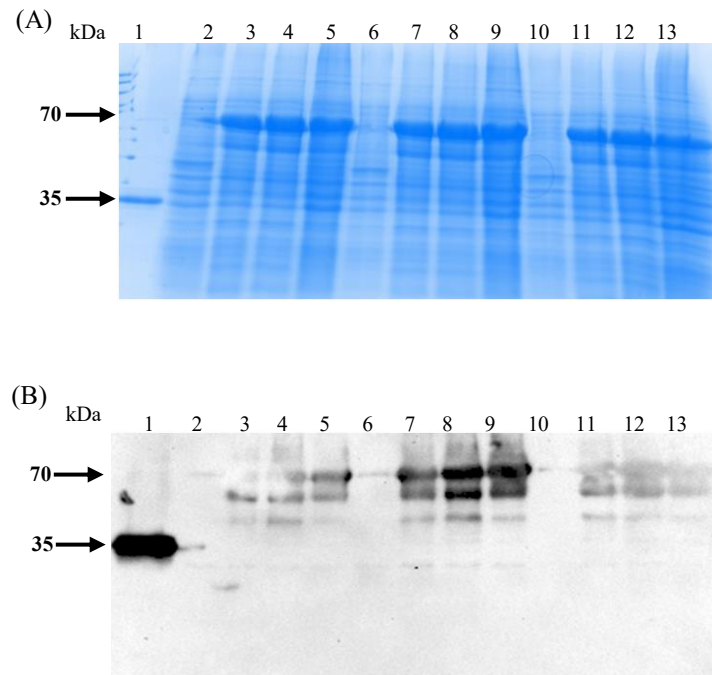


**Figura 6.** Construção dos vetores de expressão de *B. subtilis* pHT08glnHco, pHT08nglnH e pHT08cglhH. Análise de restrição vetor (A) pHT08GlnHco, (B) pHT08nglnH e (C) pHT08cglhH. Os fragmentos correspondentes aos genes *glnHco*, *nglnH* e *cglhH* foram liberados do vetor pUC57glnHco, pUC57nglnH e pUC57cglhH, respectivamente, através de digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xba*I, purificados e inseridos no vetor pHT08 através de reação de ligação. O DNA plasmidial dos possíveis clones recombinantes foram digeridos para verificar a presença dos genes de interesse.

A seguir, os vetores de expressão construídos foram transformados em linhagem 1012 de *B. subtilis* segundo protocolo descrito por Xue, Johnson e Dalrymple (1999). Os clones recombinantes foram selecionados em meio LB contendo 30 µg/ml de cloranfenicol após incubação a 37°C por uma noite. Estes foram submetidos a teste de indução para análise da expressão das proteínas GlnHco, nGlnH e cGlnH.

#### 4.1.2 Expressão da proteína GlnHco e seus fragmentos a partir de linhagens recombinantes de *B. subtilis*

Para avaliar a capacidade das linhagens recombinantes construídas *B. subtilis*/pHT08GlnHco, *B. subtilis*/pHT08nGlnH e *B. subtilis*/pHT08cGlnHco em expressar as proteínas heterólogas, nós induzimos (1 mM de IPTG) três diferentes clones de cada em meio LB com cloranfenicol (15 µg/ml) por diferentes tempos (0, 2, 4 e 16 horas) a 37°C sob agitação constante de 200 rpm. Assim, três clones recombinantes de *B. subtilis* (#1, #2 e #3) crescidos foram inoculados em meio LB contendo 15 µg/ml de cloranfenicol e mantidos em agitação (200 rpm) a 37°C até atingir a D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6-0.8, nesse momento uma amostra foi retirada e denominada de T0, depois foi adicionado 1 mM de agente indutor (IPTG) e as culturas foram mantidas em crescimento por até 16 horas. Durante esse período foi retirado amostras no tempo de 2, 4 e 16 horas após adição do agente indutor. Gel de poli-acrilamida 12,5% corado com *Comassie Blue Brilliant R250* (Figura7).

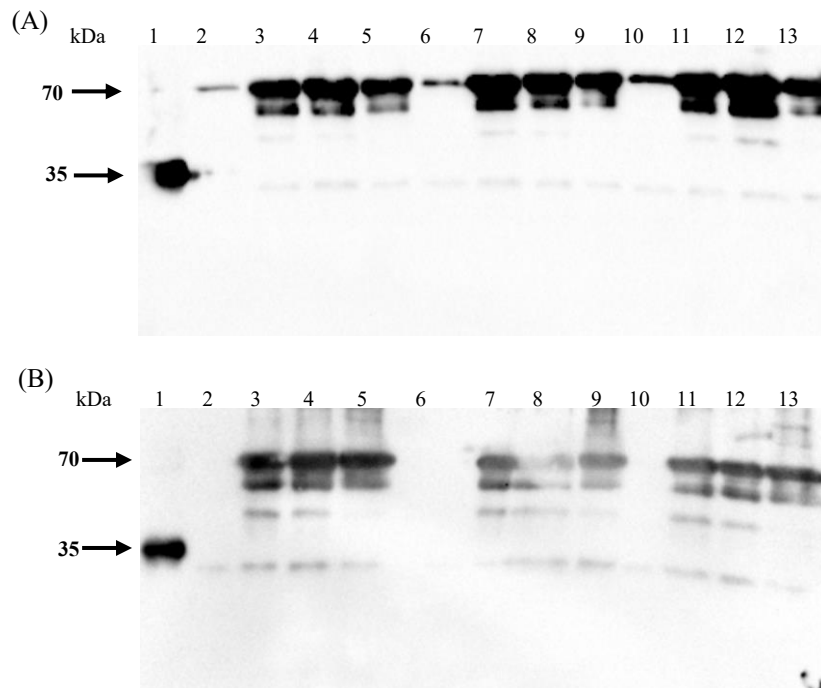


**Figura 7.** Expressão da proteína GlnHco em linhagens recombinantes de *B. subtilis*. (A) SDS-PAGE dos extratos proteicos das linhagens recombinantes de *B. subtilis* em diferentes tempos de indução. (B) Imunodeteção da proteína GlnHco com anticorpo anti-*Histag*. Amostras: 1 – proteína recombinante PstS de *S. mutans* ; 2 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #1 (T0); 3 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #1 (T2); 4 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #1 (T4); 5 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #1 (T16); 6 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #2 (T0); 7 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #2 (T2); 8 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #2 (T4); 9 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #2 (T16); 10 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #3 (T0); 11 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #3 (T2); 12 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #3 (T4); 13 - *B. subtilis*/pHT08GlnHco #3 (T16).

As proteínas recombinantes GlnHco e seus fragmentos (nGlnH e cGlnH) foram expressas em grandes quantidades em todos os tempos avaliados, como pode ser observado pela presença de uma banda proeminente com peso molecular aproximado de 70 kDa (**Figuras 7, 8 e 13 B e C**).

A imunodeteção da proteína (A) nGlnH e (B) cGlnH com extratos proteicos das linhagens recombinantes de *B. subtilis* em diferentes tempos de indução empregando anticorpo anti-*Histag*. Três clones recombinantes de *B. subtilis* (#A, #B e #C (nGlnH); #4, #5 e #6 (cGlnH)) crescidos foram inoculados em meio LB contendo 15 µg/ml de cloranfenicol e mantidos em agitação (200 rpm) a 37 °C até atingir a D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6-0.8, nesse momento uma amostra foi retirada e denominada de T0, depois foi adicionado 1 mM de agente indutor (IPTG) e as culturas foram mantidas em crescimento por até 16 horas. Durante esse período foi retirado amostras no tempo de 2, 4 e 16 horas após adição do agente indutor (**Figura 8**).

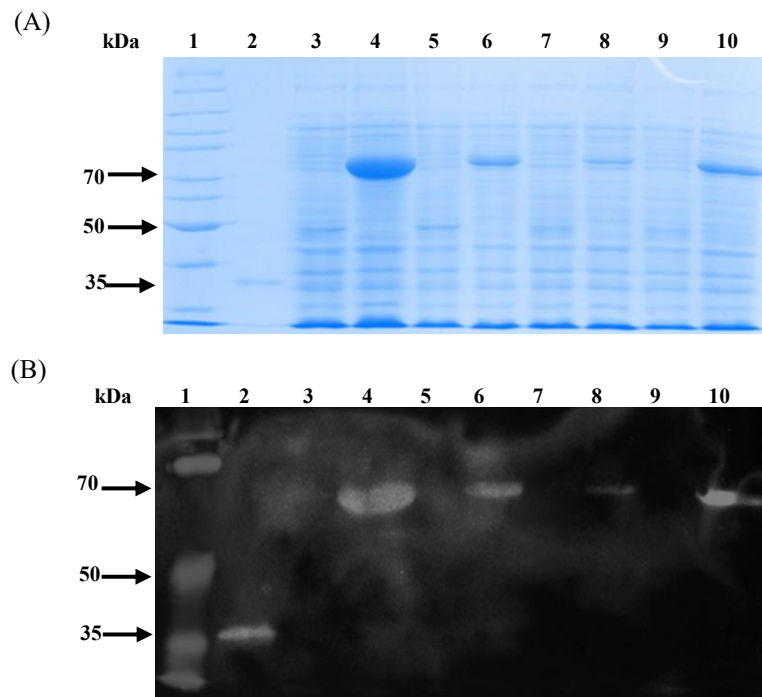




**Figura 8.** Expressão da proteína nGlnH (N-terminal) e cGlnH (C-terminal) em linhagens recombinantes de *B. subtilis*. Imunodeteção da proteína (A) nGlnH e (B) cGlnH com extratos proteicos das linhagens recombinantes de *B. subtilis* em diferentes tempos de indução empregando anticorpo anti-*Histag*. (A) Amostras: 1 – proteína recombinante PstS de *S. mutans* ; 2 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #A (T0); 3 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #A (T2); 4 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #A (T4); 5 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #A (T16); 6 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #B (T0); 7 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #B (T2); 8 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #B (T4); 9 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #B (T16); 10 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #C (T0); 11 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #C (T2); 12 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #C (T4); 13 - *B. subtilis*/pHT08nGlnH #C (T16). (B) Amostras: 1 – proteína recombinante PstS de *S. mutans* ; 2 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #4 (T0); 3 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #4 (T2); 4 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #4 (T4); 5 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #4 (T16); 6 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #5 (T0); 7 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #5 (T2); 8 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #5 (T4); 9 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #5 (T16); 10 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #6 (T0); 11 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #6 (T2); 12 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #6 (T4); 13 - *B. subtilis*/pHT08cGlnH #6 (T16).

A análise da expressão proteica por meio de *Western blot* com anticorpo contra a cauda de histidina (anti-*histag*) demonstrou bandas reativas em todos os tempos e em todas as linhagens. Podemos observar que o anticorpo monoclonal reconheceu de três a quatro bandas, a mais predominante com peso molecular aproximado de 70 kDa e outras menos reativas com aproximadamente 60 kDa, 50 kDa e 30 kDa (**Figuras 7 B e 8**). Vale ressaltar ainda, que a partir desses resultados passamos a induzir as proteínas por 2 horas.

Após esse resultado, avaliamos diferentes condições de indução para expressão da proteína GlnHco para verificar a melhor condição de cultivo (**Figura 9**).



**Figura 9.** SDS-PAGE dos extratos proteicos da linhagem recombinante de *B. subtilis* pHT08GlnHco #2 em diferentes condições de cultivo. (A) Gel de poliacrilamida 12,5% corado com *Comassie Blue Brilliant R250*. (B) Imunodeteção da proteína GlnHco com anticorpo anti-*Histag*. Amostras: 1 – Peso molecular; 2– proteína recombinante PstS (peso molecular 35 kDa); 3 – Amostra sem indução (T0); 4 – Amostra induzida (2 h) 37 °C, 200 rpm; 5 – Amostra sem indução (T0); 6 – Amostra induzida (2 h) 18 °C, 200 rpm; 7 – Amostra sem indução (T0); 8 – Amostra induzida (16 h) 4°C sem agitação; 9 – Amostra sem indução (T0); 10 – Amostra induzida (2 h) 18 °C sem agitação.

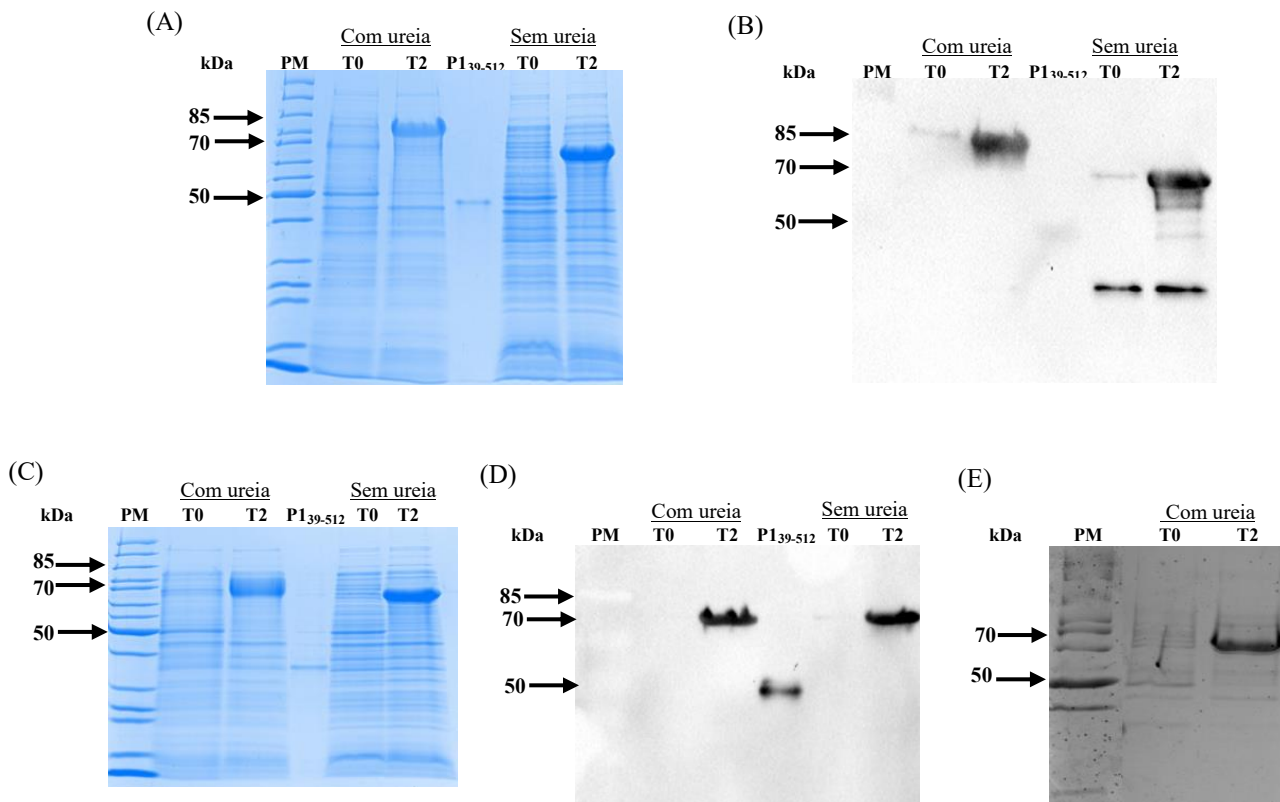
As culturas foram inoculadas em meio LB contendo 15 µg/ml de cloranfenicol e mantidas em agitação (200 rpm) a 37°C até atingir a D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6-0,8. Nesse momento uma amostra foi retirada e denominada de T0, depois foi adicionado 1 mM de agente indutor (IPTG) e as culturas foram mantidas em condições de cultivo diferentes: 37°C, por 2 horas em 200 rpm; 18°C, por 2 horas em 200 rpm; 4 °C, 16 horas, sem agitação; e 37°C por 2 horas sem agitação. Foram retiradas amostras no tempo determinado para cada condição após adição do agente indutor. As alíquotas foram analisadas por eletroforese desnaturante e o gel de poliacrilamida 12,5% foi corado com *Comassie Blue Brilliant R250*, depois foi realizado a imunodeteção da proteína GlnHco com anticorpo anti-*Histag*. Com esse resultado, foi verificado que a melhor condição de cultivo é 37°C por 2 horas sob agitação constante de 200 rpm.

#### **4.1.3 Avaliação da migração diferencial das proteínas GlnHco e seus fragmentos em gel de SDS-PAGE**

Os valores de peso molecular encontrados nas **figuras 7 B e 8** se apresentaram diferentes dos preditos para as proteínas recombinantes de interesse que seriam de 28.9 kDa, 18.1 kDa e 17.5 kDa, para GlnH completa, cGlnH e nGlnH, respectivamente. Não é incomum a observação de proteínas apresentando pesos moleculares em gel de SDS-PAGE diferentes dos preditos. Em alguns casos é consequência de modificações químicas nas proteínas, como glicosilação ou oligomerização e em outros refletem as características da proteína como composição de aminoácidos (McARTHUR *et al.*, 2007; TAVARES *et al.*, 2010; GUAN *et al.*, 2015). Sabendo disso, propusemos duas possibilidades para explicar o tamanho elevado das proteínas em gel de SDS-PAGE: i) oligomerização proteica; ii) retardo na mobilidade em gel em virtude da interação diferencial das proteínas com a matriz de poliacrilamida devido a composição de aminoácidos. Desta maneira, passamos a avaliar o motivo da migração diferencial nas proteínas recombinantes.

Para tentar determinar qual fenômeno poderia explicar a migração diferencial das proteínas recombinantes, iniciamos os estudos avaliando a possibilidade de oligomerização proteica, ou seja, a formação de homodímeros ou homotrímeros. A oligomerização proteica é um processo biológico de associação entre proteínas, normalmente iguais (homooligomerização), que em último caso visa estabilizar as proteínas protegendo-as contra a desnaturação (MILLER, *et al.*, 1987; JONES; THORNTON, 1995; HASHIMOTO; PANCHENKO, 2010). Diversos agentes redutores podem ser empregados para a desnaturação/dissociação de oligômeros, dentre esses agentes os mais comumente usados são a uréia e a guanidina (JHA; MARQUSEE, 2014).

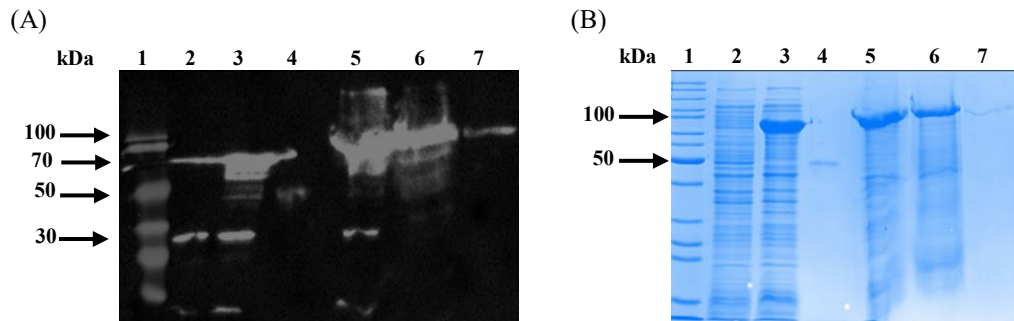
Desta forma, nós decidimos submeter os extratos proteicos com e sem indução a desnaturação/dissociação com os agentes redutores fortes (uréia 8 M e guanidina 6 M) e corrida eletroforética em SDS-PAGE. A **figura 10** demonstra os resultados após o tratamento com ureia, no qual podemos observar a presença de apenas uma banda predominante com peso molecular aproximado de 85 kDa para a proteína GlnHco, valor superior ao observado quando a amostra não é tratada com esse agente redutor, enquanto para os fragmentos não houve considerável mudança. Além disso, observamos que não estão mais presentes as bandas respectivas às proteínas de menor peso molecular (aproximadamente 30 kDa) quando tratadas com o agente redutor.



**Figura 10.** Caracterização da proteína GlnHco e cGlnH após diferentes tratamentos desnaturantes. O extrato proteico total das linhagens recombinantes *B. subtilis*/pHT08GlnHco #2 (A e B), *B. subtilis*/pHT08cGlnH (C e D) #4 ou *B. subtilis*/pHT08nGlnH #A (E) foram submetidas a diferentes tratamentos com agentes desnaturantes para avaliar o tamanho molecular da proteína. Tratamento da linhagem recombinante *B. subtilis*/pHT08GlnHco #2 com 8 M de ureia. Gel de SDS-PAGE 12.5% corado com *comassie blue brilliant R-250* das amostras (A) *B. subtilis*/pHT08GlnHco #2, (C) *B. subtilis*/pHT08cGlnH #4 e (E) *B. subtilis*/pHT08nGlnH #A; (B) e (D) *western blot* com anticorpo anti-*histag*. Legenda: (-) sem tratamento; (+) com tratamento; (T0) sem indução; (T2) 2 horas de indução.

Os mesmos resultados foram observados quando a proteína GlnHco foi desnaturada com guanidina (**Figura 11 A e B**). Esses resultados foram confirmados também por *Western blot* com anticorpo monoclonal contra a cauda de histidina (**Figura 11 A**). Esses dados indicam que as proteínas GlnHco, nGlnH e cGlnH apresentam estrutura estável mesmo sobre condições desnaturantes fracas (SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol e fervura) e que após tratamento essas foram desnaturadas/dissociadas eficientemente, isto porque proteínas não desnaturadas/dissociadas ou parcialmente desnaturadas mantêm parte da sua estrutura secundária e terciária que pode resultar em uma migração mais rápida pelo gel de poliacrilamida sendo demonstrada por pesos moleculares inferiores ao observado sem o agente redutor (JHA; MARQUSEE, 2014). Adicionalmente, esses dados sugerem que a migração diferencial dessas proteínas não é devido à oligomerização proteica, pois se esse fosse o caso, após o tratamento observaríamos o desaparecimento ou redução da quantidade

de proteína de maior peso molecular e presença de bandas proeminentes com tamanho molecular menor e aproximado ao esperado.



**Figura 11.** Caracterização da proteína GlnHco após tratamento com 6 M guanidina. O extrato proteico total da linhagem recombinante *B. subtilis*/pHT08GlnHco #2, foi submetido a tratamento com o agente desnaturante guanidina para avaliar o tamanho molecular da proteína. (A) *Western blot* com anticorpo anti-Histag. (B) Gel de SDS-PAGE 12.5% corado com *Comassie Blue Brilliant R-250* das amostras. Amostras: 1 – Padrão de peso molecular; 2 – T0 GlnHco #2 sem guanidina; 3 – T2 GlnHco #2 sem guanidina; 4 – proteína recombinante P1<sub>39-512</sub>; 5 – T2 GlnHco #2 com guanidina; 6 – S GlnHco #2 com guanidina; 7 – I GlnHco#2 com guanidina.

A outra intenção da realização do teste de indução proteica em diferentes condições, realizado e descrito anteriormente no item 4.1.2, foi avaliar se essa poderia afetar a organização estrutural da proteína recombinante GlnHco e assim reduzir a formação dos possíveis oligômeros. Como pode ser observado na **figura 9** em todas as condições testadas apenas uma banda predominante de 70 kDa foi observada tanto por coloração com *Comassie Blue* como com anticorpo específico, indicando que não há influência no comportamento proteico e sim na quantidade de material induzido, reforçando a teoria de que a migração diferencial não é devido a oligomerização.

Outra possibilidade para explicar o fenômeno de migração diferencial observado para GlnHco, cGlnH e nGlnH seria a interação dos resíduos de aminoácidos das proteínas com o gel de SDS-PAGE, visto que a predição do peso molecular é baseada apenas na composição de aminoácidos enquanto a migração eletroforética é dependente do tamanho molecular, que é combinação do peso e do tamanho molecular, mais do que só o peso molecular. De fato, alguns trabalhos descrevem que esse fenômeno pode ser observado principalmente em proteínas com alto conteúdo de resíduos de aminoácidos ácidos como o glutamato (E) e asparagina (D) apesar da exata relação entre porcentagem desses aminoácidos e o peso molecular não estar bem estabelecido (LEE, *et al.*, 2013; GUAN, *et al.*, 2015). Como podemos observar na **tabela 3** tanto a proteína GlnH completa (GlnHco) quanto seus fragmentos (cGlnH e nGlnH) apresentam um conteúdo elevado desses resíduos com valores variando de 7,5% até 9,5%, sugerindo que a mobilidade em gel alterada pode ser resultado da alta hidrofobicidade e do conteúdo de aminoácidos da proteína.

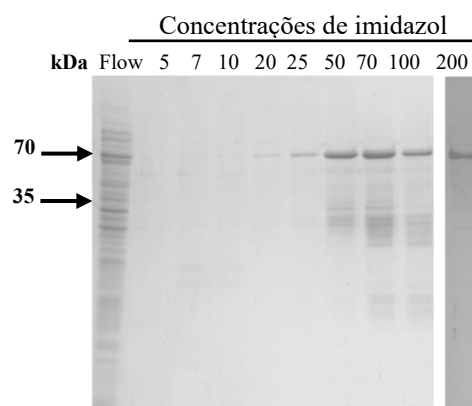
**Tabela 3.** Descrição das características das proteínas recombinantes GlnHco e seus derivados.

Proteína		GlnHco	cGlnH	nGlnH
No de aminoácidos (aa)		257	160	158
Resíduos ácidos (N°/%)	Aspartato (D)	12/4.67	7/4.38	8/5.06
	Glutamato (E)	11/4.28	5/3.13	7/4.43
	D+E	23/8.94	12/7.5	15/9.5
Hidrofobicidade		-0.53	-0.62	-0.48
pI		9.99	10.11	9.74
Peso molecular (kDa)	Predito	28.9	18.1	17.5
	SDS-PAGE	70	70	70

\*valores determinados pelo programa GPMAWlite([http://www.alphalyse.com/gpmaw\\_lite.html](http://www.alphalyse.com/gpmaw_lite.html))

#### 4.1.4 Purificação das proteínas recombinantes a partir de linhagens recombinantes de *B. subtilis*

A purificação do extrato solúvel da linhagem recombinante 1012 de *B. subtilis* contendo a proteína GlnHco induzida foi submetido à cromatografia de afinidade ao níquel baseada na presença da cauda de histidina aminoterminal fusionada à sequência da proteína. O gel de poliácridamida apresentado representa a eluição da proteína da coluna de níquel frente a concentrações crescentes de imidazol (0 a 1 M). Ao final, foi possível purificar a proteína GlnHco na fração 200 mM e na concentração de 76 ng/μl isenta de outras proteínas contaminantes e adequada para os ensaios posteriores (**Figura 12**).

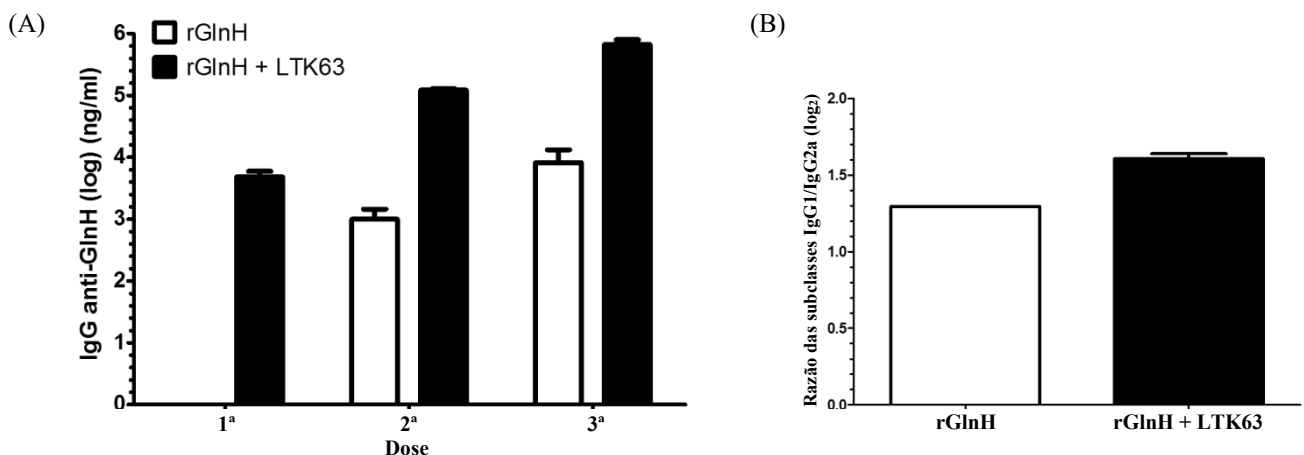


**Figura 12.** Purificação da proteína recombinante GlnHco a partir de linhagem recombinante de *B. subtilis*. Gel de poliácridamida das frações eluídas na cromatografia de afinidade de metal imobilizado da proteína GlnHco. Fluxo: flow through; 5 a 200 mM: frações eluídas a partir de gradiente de imidazol.

#### 4.1.5 Imunogenicidade da proteína rGlnHco após administração pela via sublingual

O potencial da proteína GlnHco 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 rGlnHco individualmente ou coadministrada ao

adjuvante de mucosa LTK63, 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 GlnHco foi analisada por ELISA após cada dose usando o *pool* dos soros dos animais imunizados de cada grupo. Foi observado um aumento na resposta IgG específica de GlnHco no soro de animais imunizados com a proteína, combinados ou não com o adjuvante. A presença do adjuvante aumentou a resposta imune induzida após a primeira dose, enquanto a proteína sem o adjuvante induziu quantidades significativas de anticorpos no soro somente após a segunda dose (**Figura 13 A**). Os níveis de subclasse de IgG no soro também foram dosados e a razão IgG1/IgG2a determinada nos grupos vacinais (**Figura 13 B**). A imunização com a proteína rGlnHco sozinha ou com o adjuvante LTK63, estimulou níveis mais elevados da subclasse IgG1 indicando uma resposta imune tendendo para uma resposta tipo Th2 (humoral). Tomados em conjunto, esses dados indicam que a rGlnHco é altamente imunogênica para camundongos após administração via sublingual, resultando na indução de resposta imune sistêmica específica.



**Figura 13.** Respostas imunes específicas de GlnH após imunização sublingual. (A) Respostas de soro anti-GlnHco IgG. O soro de ratos BALB/c imunizados sublingualmente com 5 µg de rGlnHco sozinha (barras brancas) ou em combinação com 5 µg de LTK63 como adjuvante (barras pretas) foram coletados duas semanas após cada dose. (B) Respostas de subclasse de IgG anti-GlnH no soro. Os ensaios ELISA foram realizados com amostras de soro reunidas usando rGlnHco purificado como antígeno imobilizado. Os dados são baseados em duas experiências de imunização realizadas independentemente e expressas como médias ± SEM.

#### 4.1.6 Funcionalidade *in vivo* dos anticorpos rGlnHco-específicos

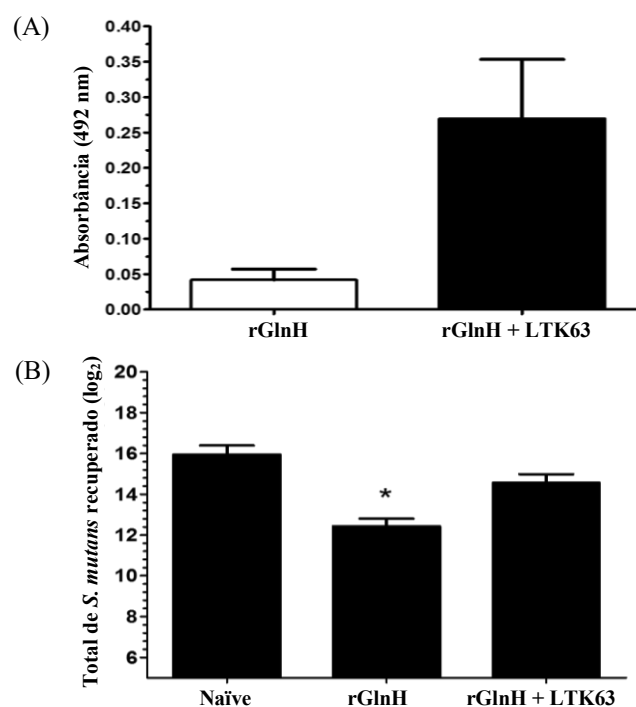
Para determinar a funcionalidade dos anticorpos rGlnHco-específicos obtidos após a imunização, avaliamos a capacidade desses anticorpos interferirem na colonização oral de camundongos BALB/c por *S. mutans* em ensaios de soro-neutralização *in vivo* e desafio.

Para a soro-neutralização, inicialmente testamos a capacidade dos anticorpos no soro de reconhecer a proteína GlnH nativa na superfície de *S. mutans* (**Figura 14 A**). Foi

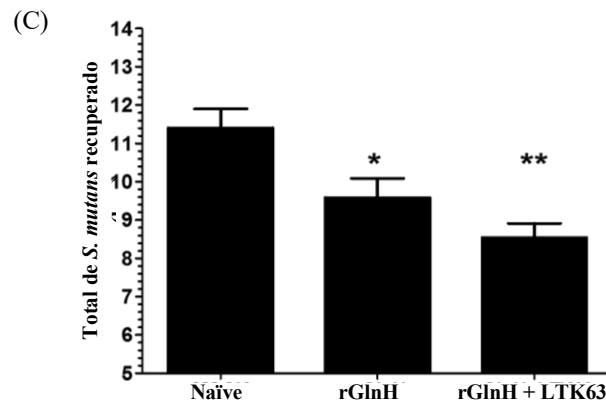
observado reatividade dos anticorpos anti-GlnHco nos soros de camundongos imunizados com GlnHco recombinante sozinha ou com adjuvante reconhecendo a GlnH nativa expressa na superfície do patógeno. Contudo, o soro de camundongos que receberam a proteína recombinante junto com o adjuvante teve um aumento no nível de reconhecimento.

Os imunoenaios foram realizados usando células inteiras de *S. mutans* pré-tratadas ( $1 \times 10^8$  ufc/poço) como antígenos de fase sólida ligados em placas de ELISA. Em seguida, testamos a eficácia da soro-neutralização *in vivo* por células pré-incubadas da linhagem NG8 de *S. mutans* com *pools* de soro coletados de animais imunizados após a terceira dose, e, posteriormente, inoculadas na cavidade oral dos camundongos *naïve*, previamente tratados como descrito anteriormente. Os animais inoculados com bactérias incubadas com anticorpos gerados em camundongos imunizados com rGlnHco sozinha ou coadministrada com LTK63 mostraram colonização bacteriana reduzida após 6 horas, com uma leve redução na colonização naqueles camundongos que receberam o soro de animais imunizados apenas com a proteína recombinante (**Figura 14 B**).

Como controle negativo, os camundongos *naïves* foram tratados com células da estirpe NG8 previamente incubadas com soro aumentado com PBS. Interessante, apesar do melhor reconhecimento de proteína nativa por anticorpos adjuvados, isso não se refletiu em uma melhora do efeito de neutralização *in vivo*, pelo contrário, nossos dados mostraram que os anticorpos criados com proteína isolada eram mais efetivos para neutralizar a ligação bacteriana à superfície dental dos camundongos. Esses dados sugerem que a coadministração com adjuvante pode impactar quantitativamente, mas não qualitativamente, a resposta imune.







**Figura 14.** Avaliação funcional da atividade de anticorpos específicos de GlnH. (A) Reatividade dos anticorpos anti-GlnHco à proteína GlnH nativa expressa na superfície das células de *S. mutans*. (B) Neutralização do soro da aderência de *S. mutans* à cavidade oral de camundongos naïve. Os dados representam duas experiências independentes e são expressas como média ± SEM. \*,  $p < 0,05$  (teste t de Student e teste de Mann-Whitney como pós-teste). (C) Inibição da colonização da cavidade oral de *S. mutans* após imunização sublingual com proteína rGlnHco. Os dados representam duas experiências independentes e são expressos como média ± SEM. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  (teste t de Student e teste de Mann-Whitney como pós-teste).

Determinamos também se a vacinação conferiria uma imunidade protetora ativa à colonização oral pela cepa de *S. mutans* NG8. Para esta proposta, três semanas após a última dose, os camundongos foram submetidos à profilaxia oral e inoculados com *S. mutans*, conforme relatado anteriormente (BATISTA *et al.*, 2014b).

Observamos uma diminuição significativa no número de bactérias recuperadas da cavidade oral em camundongos imunizados com rGlnH sozinha ou coadministrada com o adjuvante, em comparação com o grupo controle (Fig. 14 C). Os resultados indicam que a estratégia vacinal baseada na proteína GlnHco e na administração sublingual confere imunidade protetora à colonização oral por *S. mutans*.

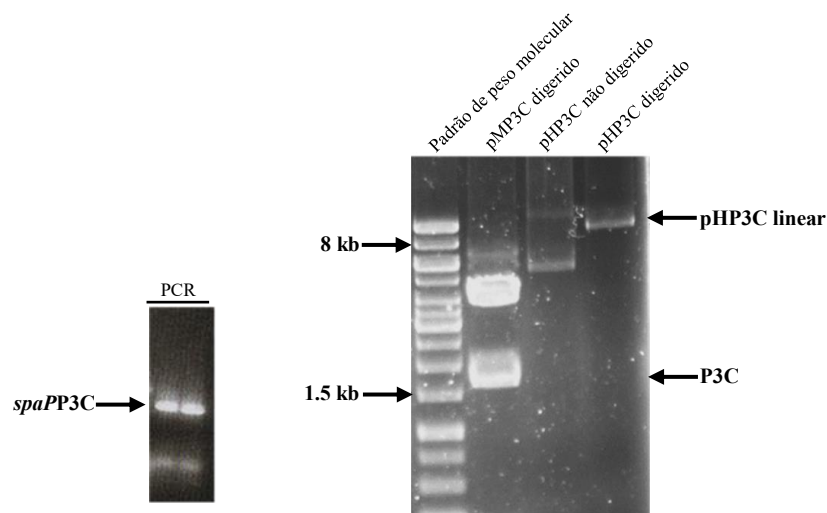
## 4.2 Resultados relacionados com a proteína P3C

### 4.2.1 Construção do vetor de expressão de *B. subtilis* contendo o gene que codifica para a P3C

Para avaliar o potencial da região de ligação à saliva da porção C-terminal da proteína P1 de *S. mutans* como alvo vacinal em um protocolo de imunização de subunidade de mucosa em comparação com a região de ligação à saliva da porção N-terminal representado pela proteína P1<sub>39-512</sub> recombinante (**Figura 1**), construímos um plasmídeo baseado no sistema de expressão pHT de *B. subtilis* que abriga a repetição da região final de P (P3) e C-terminal (resíduos de aminoácidos 921-1486) de P1-adesina. Para isto, inicialmente amplificamos o fragmento de DNA clonado correspondente à porção P3C (nucleotídeos 2761 até 4458; resíduos de aminoácidos 39-308) a partir do gene *spaP* de *S. mutans* cepa NG8 por meio de

reação em cadeia da polimerase e depois clonamos no vetor pCR2.1-TOPO, originando o vetor pMP3C (**Figura 15**).

Na **figura 15**, podemos observar que a digestão do vetor construído pMP3C com as enzimas *Bam*HI e *Aat*II liberou dois fragmentos, o primeiro referente ao vetor de clonagem (3,9 kb) e o segundo ao inserto P3C com tamanho molecular aproximado de 1,7 kb. O vetor construído foi confirmado por sequenciamento (dado não mostrado). Por fim, o vetor de expressão construído foi transformado em linhagem WB800 de *B. subtilis* segundo protocolo descrito por Xue, Johnson e Dalrymple (1999) e os clones recombinantes selecionados foram submetidos a teste de indução para análise da expressão da proteína P3C. Após o fragmento P3C ser subclonado no vetor de expressão pHT08 de *B. subtilis*, produziu o plasmídeo pHP3C, confirmado por linearização do DNA plasmídico com a enzima de restrição *Bam*HI (8,8 kb) (**Figura 15**). O plasmídeo de expressão final pHTP3C foi transformado na cepa recombinante WB800 de *B. subtilis* originando a cepa WHTP3C.



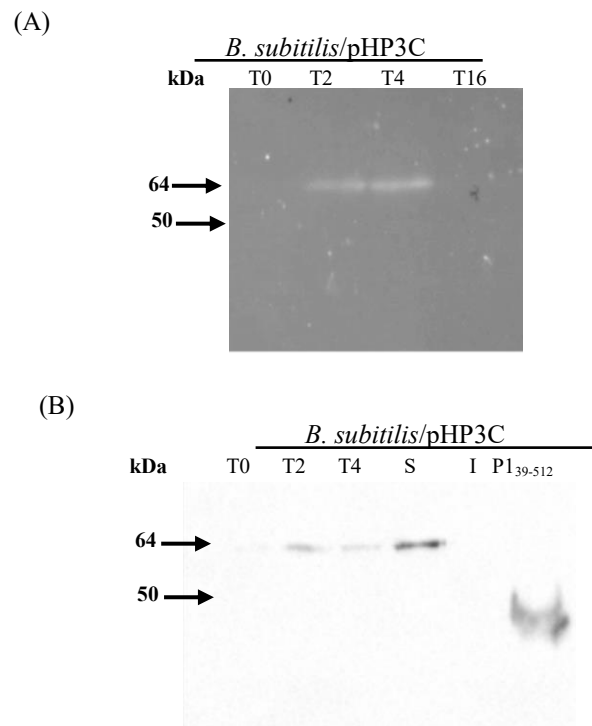
**Figura 15.** Construção dos vetores de clonagem e de expressão contendo os fragmentos do gene *spaP* de *S. mutans* (P3C). Construção do vetor de expressão pHP3C para *B. subtilis* que abrigam o fragmento C-terminal do gene *spaP* de *S. mutans* (P3C). Análise de restrição dos vetores construídos pMP3C (clonagem) e pHP3C (expressão). Os vetores foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Aat*II ou só com a enzima *Bam*HI (vetor pHP3C).

#### **4.2.2 Expressão e purificação da proteína recombinante P3C derivada da proteína P1 de *S. mutans*.**

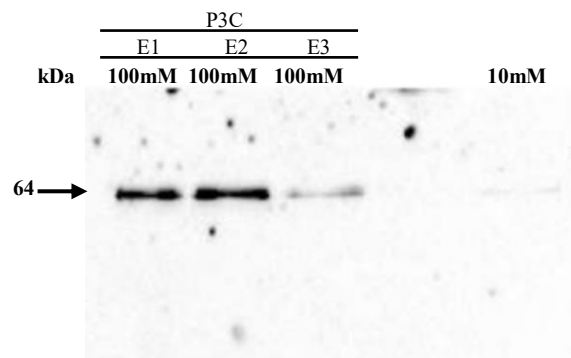
Para avaliar a superexpressão da proteína recombinante P3C, as colônias da linhagem recombinante WB800 de *B. subtilis* com o vetor pHP3C foram pré-inoculadas em meio LB com cloranfenicol (30 µg/ml) por uma noite a 37°C.

A análise da expressão proteica por meio de *Western blot* com anticorpo contra a cauda de histidina revelou a presença de bandas positivas nos tempos 2 h e 4 h, com peso molecular aproximado de 64 kDa, porém a expressão foi mais intensamente observada após 4 horas de indução (**Figura 16 A**). Com base nos resultados, passamos a induzir essas linhagens por um período máximo de 4 horas. Por fim, avaliamos em qual fração celular a proteína P3C estava expressa e como podemos observar na **figura 16 B**, a proteína pôde ser encontrada apenas na fração solúvel.

Para a purificação da proteína P3C a fração solúvel induzida, por 4 horas, da linhagem H08P3C foi submetida à cromatografia de afinidade com resina contendo níquel e sua eluição foi feita com concentrações crescentes de imidazol (10 mM até 1M). A proteína P3C foi eluída com sucesso usando 100 mM de imidazol como pode ser observado na **figura 17** e após imunodeteccção com anticorpo anti-*histag* pela presença de uma única banda de aproximadamente 64 kDa.



**Figura 16.** Expressão da proteína recombinante P3C em linhagem recombinante WB800 de *B. subtilis*. Imunodeteccção da proteína P3C com anticorpo anti-*Histag* dos extratos proteicos da linhagem recombinante de *B. subtilis*. Amostras: T0 – *B. subtilis*/pHP3C (sem indução); T2 – *B. subtilis*/pHP3C (2 horas de indução); T4 – *B. subtilis*/pHP3C (4 horas de indução); T16 – *B. subtilis*/pHP3C (16 horas de indução); S – *B. subtilis*/pHP3C (fração solúvel); I – *B. subtilis*/pHP3C (fração insolúvel); 7 – proteína recombinante P1<sub>39-512</sub> de *S. mutans*.



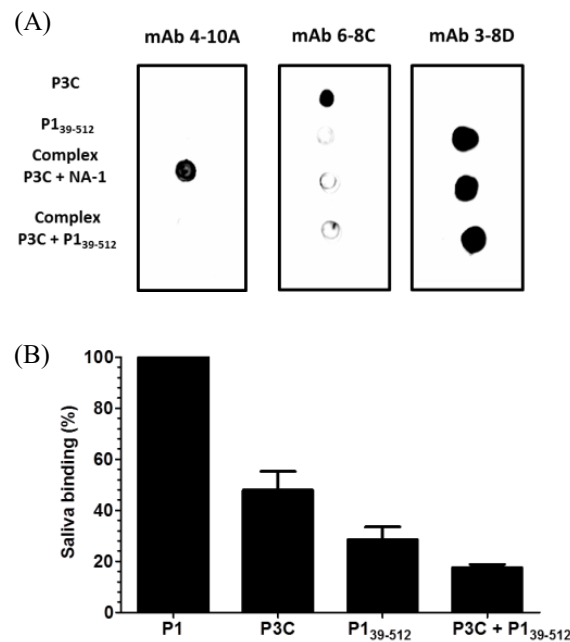
**Figura 17.** Purificação da proteína recombinante P3C a partir de linhagem recombinante de *B. subtilis*. *Western blot* com anticorpo anti-*Histag* das frações eluídas na cromatografia: E1, E2 e E3 – Frações obtidas com 100 mM de imidazol; Fração obtida com 10 mM de imidazol.

#### 4.2.3 Caracterização da proteína P3C recombinante produzida na cepa de *B. subtilis*

Em seguida, verificamos se as proteínas recombinantes P1<sub>39-512</sub> e P3C podem interagir entre si e restaurar a estrutura tridimensional da P1 composta pelas regiões pré-A e P. Como pode ser visto na **figura 18 A**, com exceção da P3C, todas as proteínas sozinhas ou dentro do complexo são reconhecidas pelo anticorpo monoclonal mAb 3-8D, que reconhece os epítomos lineares na região A. Por outro lado, apenas a proteína P3C sozinha é reativa com mAb 6-8C, que reconhece os epítomos na região C-terminal da proteína P1. Em contraste, o anticorpo monoclonal 4-10A reagiu com o complexo formado pela proteína P3C e NA-1, demonstrando que a estrutura conformacional P1 é restaurada, mas não a P1<sub>39-512</sub> e P3C, ou as proteínas sozinhas, sugerindo que essas proteínas em conjunto não se associaram formando o complexo (**Figura 18 A**).

Na avaliação da formação de complexos de fragmentos N-terminal e C-terminal por imunoensaio, as proteínas purificadas P3C e P1<sub>39-512</sub> (400 ng) isoladas ou previamente misturadas foram aplicadas a membrana de nitrocelulose e incubadas com monoclonos mAb 4-10A, mAb 6-8C e mAb 3-8D.

Também avaliamos se a proteína P3C recombinante produzida por *B. subtilis* preserva o local de ligação à saliva na região C-terminal da P1. Então, por ensaio ELISA, a proteína P3C, bem como a P1<sub>39-512</sub> sozinhas ou ambas as proteínas em combinação, conseguiram se ligar à saliva humana, indicando que, além da P1<sub>39-512</sub> recombinante, a proteína P3C preserva a região de ligação à saliva, uma característica importante para um alvo vacinal (**Figura 18 B**).



**Figure 18.** Caracterização da proteína P3C recombinante produzida na cepa de *B. subtilis*. (A) Avaliação da formação de complexos de fragmentos N-terminal e C-terminal por imunodot. (B) Capacidade da proteína P3C recombinante produzida em *B. subtilis* em apresentar adesão à saliva. Os resultados representam dois ensaios realizados de forma independente.

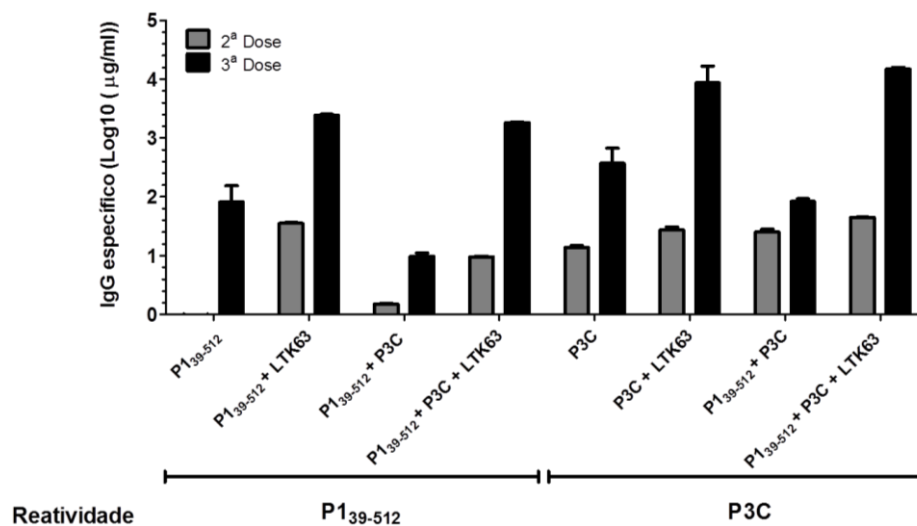
Também avaliamos se a proteína P3C recombinante produzida por *B. subtilis* preserva o local de ligação à saliva na região C-terminal da P1. Por ensaio ELISA, a proteína P3C, bem como a P1<sub>39-512</sub> sozinhas ou ambas as proteínas em combinação, conseguiram se ligar à saliva humana, indicando que, além da P1<sub>39-512</sub> recombinante, a proteína P3C preserva a região de ligação à saliva, uma característica importante para um alvo vacinal (**Figura 18 B**).

#### 4.2.4 Resposta imune sistêmica após imunização intranasal com a proteína P3C e P1<sub>39-512</sub>.

Nos últimos anos nosso grupo tem estudado e demonstrado o potencial da proteína recombinante P1<sub>39-512</sub> produzida e purificada a partir de linhagem recombinante de *B. subtilis* como um alvo em estratégias vacinais contra a cárie dental humana (TAVARES *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2014a; BATISTA *et al.*, 2014b). Entretanto, recentemente foi descrito um segundo sítio de ligação à saliva humana que apresenta potencial como alvo vacinal no controle da doença cárie (HEIM *et al.*, 2014; ROBINETTE *et al.*, 2014). Com base nisso, decidimos avaliar se os dois antígenos descritos anteriormente teriam características imunogênicas semelhantes e seriam igualmente imunoprotetores. Além disso, passamos a avaliar se a combinação entre eles poderia constituir o candidato vacinal “ideal” para o

controle da cárie dental já que representam os dois sítios de ligação da bactéria à saliva humana.

Assim, animais BALB/c foram imunizados com três doses das proteínas P3C e P1<sub>39-512</sub> (5 µg/dose) recombinante isoladas, combinadas ou coadministradas com o adjuvante LTK63 (5 µg/dose). Os soros dos animais foram coletados 10 dias após cada dose com a finalidade de avaliar a resposta imune sistêmica. Os ensaios imunológicos demonstraram que ambas as proteínas recombinantes isoladas foram capazes de induzir resposta sistêmica específica após as três doses do regime vacinal por via intranasal (81 µg/ml com a proteína P1<sub>39-512</sub> e 371 µg/ml com a proteína P3C), sendo que a proteína P3C já foi capaz de induzir níveis detectáveis de anticorpos IgG (13,7 µg/ml) após a segunda dose. A associação das duas proteínas resultou em redução dos níveis de anticorpos específicos para cada antígeno alvo com valores aproximados de 9,8 µg/ml (P1<sub>39-512</sub>) e 83,3 µg/ml (P3C) (**Figura 19**).



**Figura 19.** Avaliação da resposta imunológica específica contra a proteína P1<sub>39-512</sub> e P3C após imunização pela via intranasal de camundongos. Animais BALB/c foram imunizados com três doses da proteína P1<sub>39-512</sub> ou P3C recombinante (5 µg) associada ou não ao adjuvante LTK63 (5 µg) pela via intranasal com intervalo de quinze dias entre as doses. As amostras de soro foram coletadas duas semanas após cada dose. Os anticorpos IgG anti-P1<sub>39-512</sub> ou anti-P3C específicos foram avaliados em *pool* por meio de ensaio de ELISA com as proteínas recombinantes (separadas) como antígeno de fase sólida (200 ng/poço).

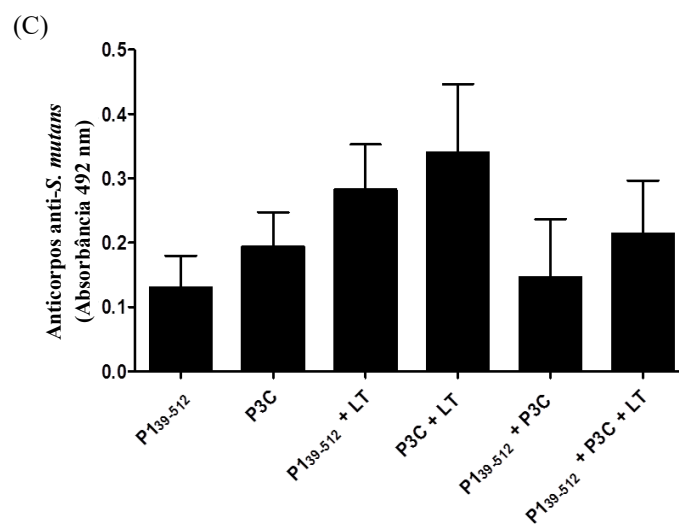
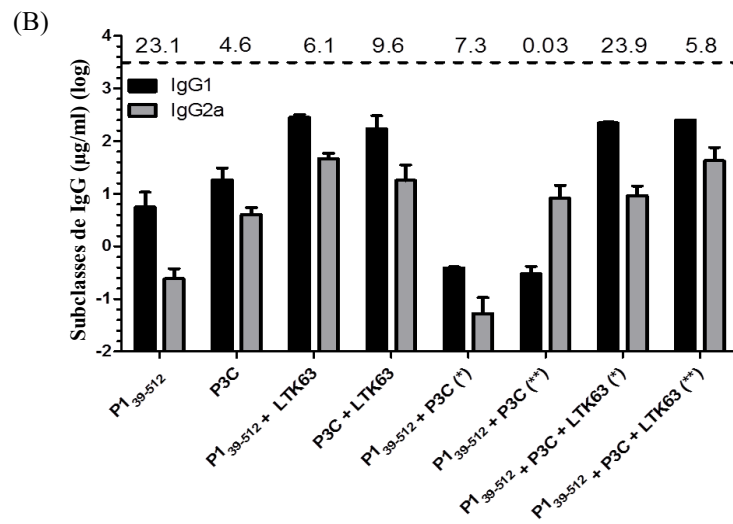
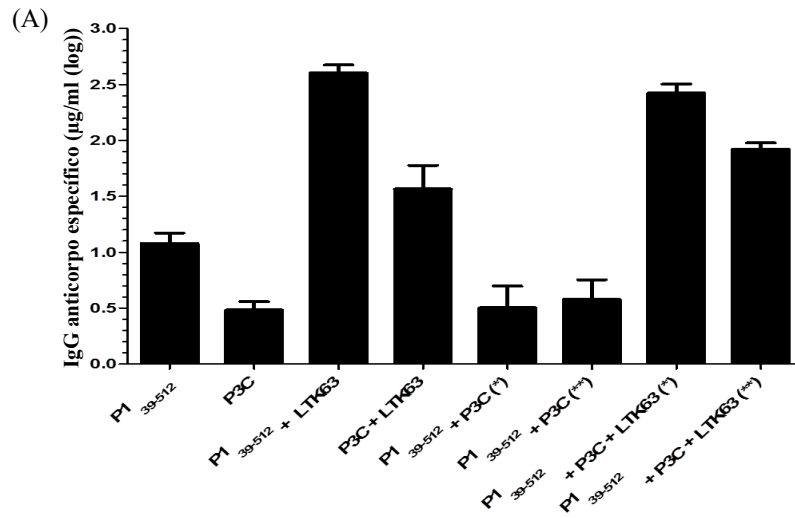
Esses dados sugerem que a proteína P3C recombinante construída é capaz de estimular o sistema imunológico e que pelo menos, para o potencial imunogênico dessas proteínas, a associação entre elas é deletéria. Por outro lado, a associação com o adjuvante LTK63 potencializou a resposta imune sistêmica aos antígenos usados, independentes, aumentando a concentração de anticorpos específicos logo após a segunda dose, com a maior concentração sendo obtida após a terceira dose (2,4 mg/ml para a proteína P1<sub>39-512</sub> e 8,6 mg/ml para a proteína P3C) (**Figura 19**). Adicionalmente, a combinação entre elas e a coadministração com adjuvante aumentou a resposta específica para ambas proteínas quando comparadas em

combinação sem adjuvante, com valores variando entre 1,8 mg/ml (P1<sub>39-512</sub>) e 14,9 mg/ml (P3C) (**Figura 19**). Esses dados indicam que a adição da LTK63 tem impacto positivo na imunogenicidade dos antígenos sozinhos ou combinados.

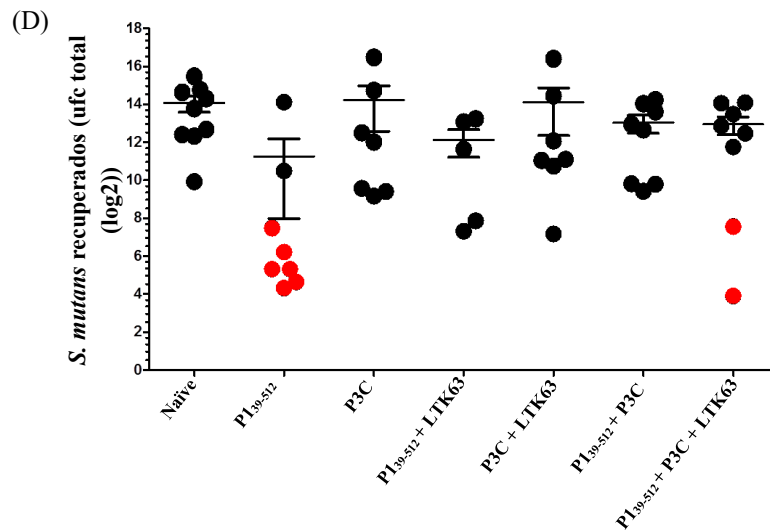
#### ***4.2.5 Os anticorpos anti-P1<sub>39-512</sub> são capazes de proteger os camundongos contra a colonização oral por anticorpos de S. mutans, mas não anti-P3C.***

A imunização intranasal com proteínas P3C e P1<sub>39-512</sub> isoladamente foi capaz de induzir níveis razoáveis de anticorpos IgG específicos (3 µg/ml e 11 µg/ml, respectivamente) após o regime vacinal, no entanto, a coadministração com o adjuvante LTK63 em ambos os casos foi responsável por aumentar significativamente a quantidade de anticorpos IgG (36,7 µg/ml e 401 µg/ml). Em contraste, a administração de ambas as proteínas em conjunto reduziu os anticorpos contra a proteína P1<sub>39-512</sub> (3,1 µg/ml), mas não os específicos para a P3C (3,7 µg/ml) e a coadministração com LTK63 restaurou, em parte, os níveis de anticorpos anti-P1<sub>39-512</sub> específicos (265 µg / ml) e os anticorpos aumentaram contra a proteína P3C (83,7 µg/ml) (**Figura 20 A**). Os dados indicam que a proteína P3C recombinante construída é capaz de estimular o sistema imunológico e que pelo menos para o potencial imunogênico dessas proteínas, a associação de ambos os locais de ligação da saliva da proteína P1 é deletéria para a resposta imune dirigida contra o sítio de ligação à saliva N-terminal, mas não para o C-terminal, e que a inclusão do adjuvante LTK63 é vantajosa para aumentar a resposta imune sistêmica contra as proteínas P3C e P1<sub>39-512</sub>.

Os níveis das subclasses de IgG no soro também foram medidos e expressos pela relação IgG1/IgG2a relativa (**Figura 20 B**). Com exceção da resposta imune contra P3C do grupo de vacina P1<sub>39-512</sub>+P3C, todos os outros grupos de imunização estimularam níveis mais altos da subclasse IgG1 indicando uma resposta imune com tendência para Th2 (**Figura 20 B**). Os dados sugerem que a proteína P3C recombinante construída é capaz de estimular o sistema imunológico e que pelo menos para o potencial imunogênico dessas proteínas, a associação entre elas é deletéria.







**Figura 20.** Respostas imunes específicas de *S. mutans* P1 em camundongos imunizados via intranasal com fragmentos de proteínas P1. (A) Respostas P1<sub>39-512</sub> IgG específicas no soro. Camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados por via intranasal com três doses de P1<sub>39-512</sub> purificada, P3C ou ambas as proteínas com ou sem LT co-administrado como adjuvante. As amostras de soro foram coletadas duas semanas após a terceira dose e os soros individuais foram submetidos a IgG-ELISA com a respectiva proteína recombinante como antígeno ligado à fase sólida (antígeno de fase sólida: \*, P1<sub>39-512</sub> ou \*\*, P3C). Cada ponto representa a resposta imune para cada animal imunizado. (B) Respostas de subclasses de IgG por grupos de vacinas. Os dados representam duas experiências executadas independentemente e os resultados são apresentados como  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$ . Os valores acima da linha pontilhada representam a relação IgG1/IgG2a. (C) Reatividade dos soros contra a proteína P1 nativa na superfície da bactéria. Os imunoenaios foram realizados usando células inteiras de *S. mutans* ( $1 \times 10^8$  /poço) como fase sólida em placas de ELISA. Cada ponto representa a resposta individual do animal. (D) Teste oral de camundongos por *S. mutans* após imunização intranasal com proteína P1<sub>39-512</sub> ou proteína P3C. Inibição da colonização oral por patógeno bacteriano *S. mutans* após protocolo de imunização completa. Três semanas após a última dose, os animais foram pré-tratados com saliva humana e depois desafiados com células de *S. mutans* NG8. Os swabs de cavidade oral foram recolhidos e plaqueados em placas de Petri contendo Mitis Salivarius-bacitracina média (0,2 U/ml) e sacarose (5%). Os dados representam três experimentos independentes e são expressos como o erro padrão da média ( $\pm$  SE). \*\*\*,  $p < 0,05$ . Cada ponto representa um animal imunizado e desafiado por *S. mutans*. Os pontos vermelhos representam a menor carga bacteriana por animal em cada grupo.

Todos os grupos vacinais foram capazes de reconhecer a proteína P1 nativa na superfície bacteriana de *S. mutans*, no entanto, a coadministração do LTK63 com a P3C e P1<sub>39-512</sub> isoladamente foi benéfico, aumentando o nível de reatividade com o patógeno oral nesses soros, mas não quando ambas as proteínas estavam juntas (**Figura 20 C**). Para esse experimento os imunoenaios foram realizados usando células inteiras de *S. mutans* ( $1 \times 10^8$  /poço) como fase sólida em placas de ELISA. Cada ponto representa a resposta individual do animal.

Então, perguntamos se os animais vacinados com cada fragmento de ligação à saliva da proteína P1 de *S. mutans* individualmente e/ou em associação e com ou sem adjuvante poderiam melhorar o potencial de proteção dos anticorpos anti-P1. Para respondermos foi feito o teste oral de camundongos por *S. mutans* após imunização intranasal com proteína P1<sub>39-512</sub> ou proteína P3C para avaliar a inibição da colonização oral por patógeno bacteriano,

*S. mutans*, após protocolo de imunização completa (**Figura 20 D**). Três semanas após a última dose, os animais foram pré-tratados com saliva humana e depois desafiados com células de *S. mutans* NG8. Os swabs de cavidade oral foram recolhidos e plaqueados em placas de Petri contendo Mitis Salivarius-bacitracina média (0,2 U/ml) e sacarose (5%). Os dados representam três experimentos independentes e são expressos como o erro padrão da média ( $\pm$  SE). \*\*\*,  $p < 0,05$ . Cada ponto representa um animal imunizado e desafiado por *S. mutans*. Os pontos vermelhos representam a menor carga bacteriana por animal em cada grupo.

Conforme demonstrado na **figura 20 D**, os grupos vacinais que receberam a proteína P1<sub>39-512</sub> isoladamente ou em conjunto com o adjuvante LTK63 foram capazes de reduzir a colonização bacteriana para  $2,4 \times 10^3$  UFC e  $4,4 \times 10^3$  UFC, respectivamente. Isso representa uma redução na carga bacteriana na cavidade oral de camundongos de 83% e 69% em relação ao grupo controle (*naïve*) ( $1,4 \times 10^4$  de UFC total recuperado de *S. mutans*). Enquanto isso, os animais imunizados com proteína P3C isolada ou com adjuvante tiveram um aumento na colonização bacteriana de 11,1% ( $1,9 \times 10^4$  de UFC total recuperado de *S. mutans*) e 2,1% ( $1,7 \times 10^4$  de UFC total recuperado de *S. mutans*).

A associação de P1<sub>39-512</sub> ao segundo local de ligação (P3C) aumentou o efeito protetor dos soros com redução da colonização bacteriana de 42% (P1<sub>39-512</sub> + P3C,  $8,3 \times 10^3$  de UFC total recuperado de *S. mutans*) e 45% (P1<sub>39-512</sub> + P3C + LTK63 (SPL),  $7,8 \times 10^3$  de UFC total recuperado de *S. mutans*). Os dados sugerem que, usando este modelo animal, os anticorpos protetores são aqueles dirigidos contra o local de ligação da saliva localizado no fragmento N-terminal da proteína P1 (anticorpos anti-P1<sub>39-512</sub>) e que, de fato, anticorpos contra o segundo local de ligação, a região C-terminal, ajudou o patógeno a colonizar a cavidade bucal dos camundongos.

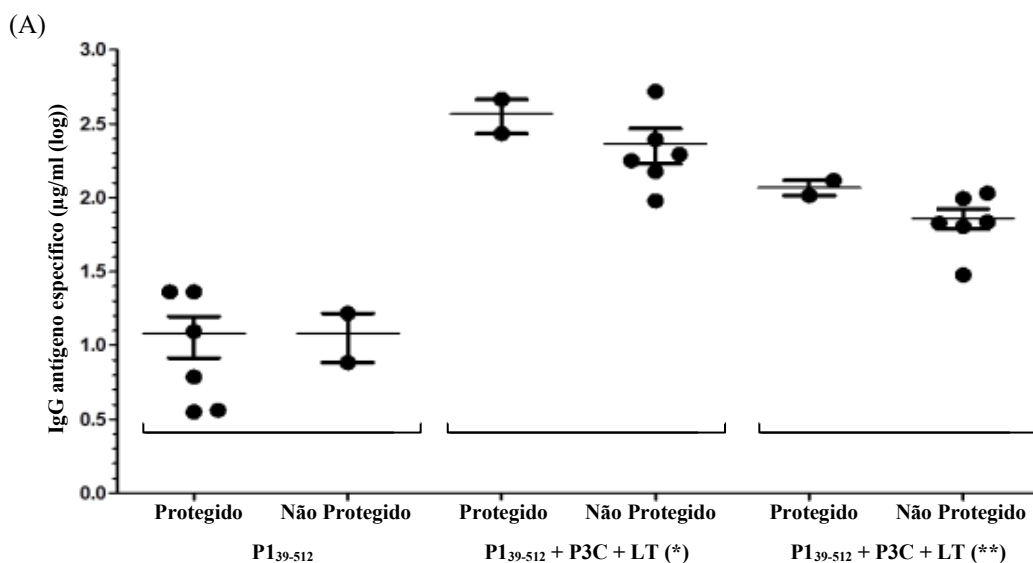
#### ***4.2.6 A imunoassinatura IgG pode diferenciar animais com uma resposta protetora daqueles com uma resposta não protetora***

Curiosamente, quando analisamos cuidadosamente os dados individuais de proteção, observamos uma heterogeneidade na capacidade de controlar a infecção por *S. mutans* por cada animal que não pode ser totalmente explicado por níveis específicos de anticorpos. Portanto, perguntamos se esta é a diferença de especificidade de anticorpos levantada por cada animal.

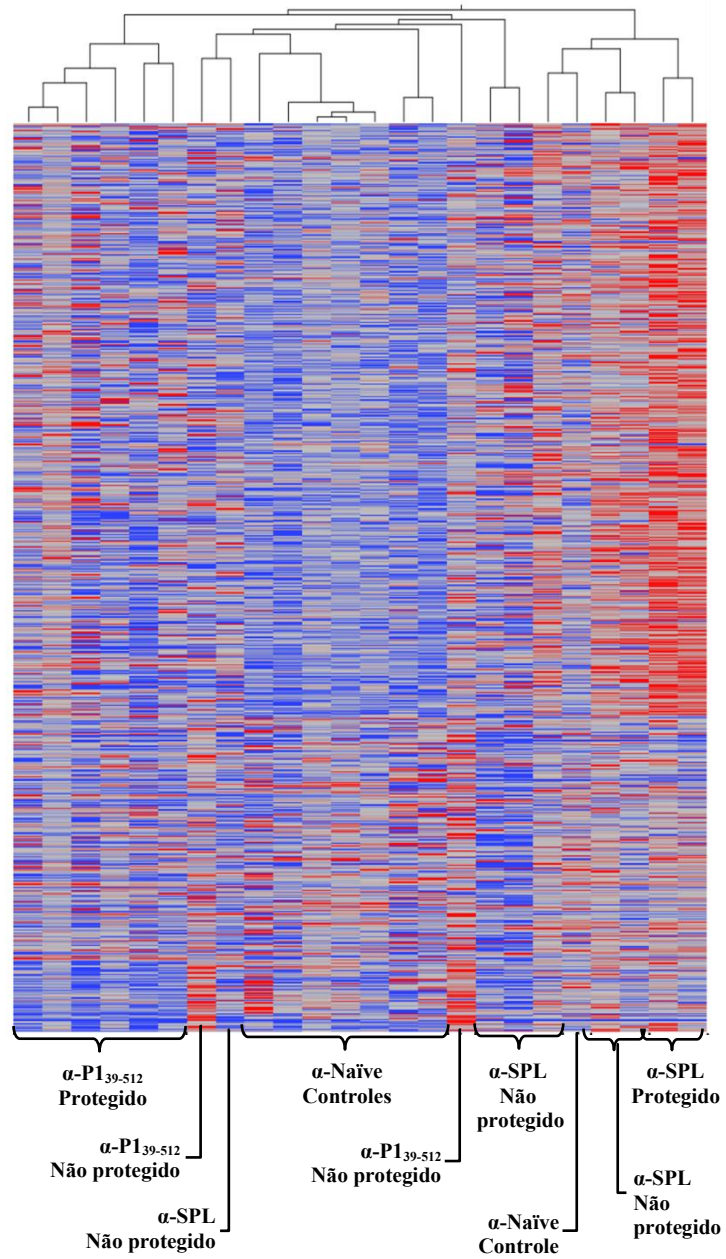
Para responder a estas perguntas, selecionamos dois grupos vacinais para serem analisados pela tecnologia de imunoassinatura. O primeiro grupo vacinal foi dos animais que

receberam apenas a proteína P1<sub>39-512</sub>, a melhor resposta protetora (média dos animais) no desafio dos camundongos, apesar de observarmos que nem todos os animais terem sido capazes de controlar efetivamente a colonização por bactérias (P1<sub>39-512</sub> grupo: 6 dos 8 animais) (**Figura 20 D**, pontos negros). E o segundo grupo vacinal, foi o imunizado com todas as proteínas recombinantes (P3C e P1<sub>39-512</sub>) em combinação com o adjuvante (o grupo foi designado SPL), onde 2 de 8 animais foram protegidos (pontos vermelhos) (**Figura 20 D**).

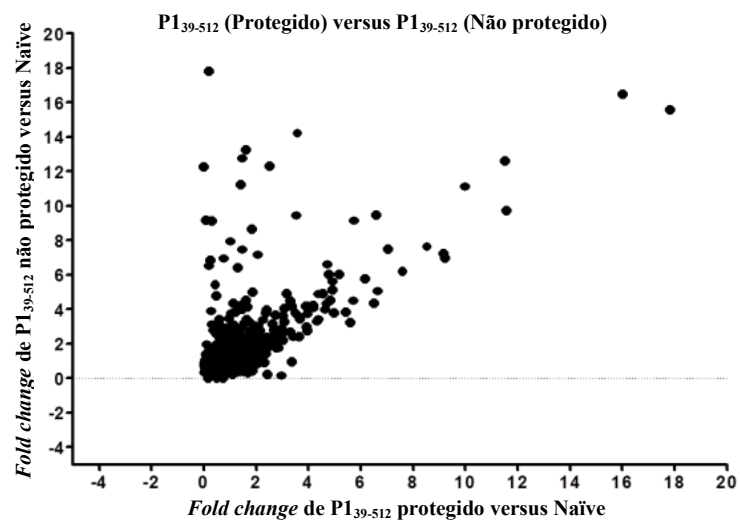
Inicialmente, avaliamos a quantidade de anticorpos específicos nos camundongos protegidos contra os camundongos não protegidos e não observamos diferenças entre eles para explicar o resultado do desafio (**Figura 21 A**). Em seguida, as imunoassinaturas de todos os animais protegidos foram comparadas com animais não protegidos. Baseado em imunoassinatura individual, os camundongos foram divididos em três grupos: o primeiro grupo foi composto por animais protegidos (animal 1, 2, 3, 6, 7 e 8) da imunização com a proteína P1<sub>39-512</sub>; O segundo, continha animais não protegidos 4 e 5 do grupo vacinal P1<sub>39-512</sub>, todos os animais controle (PBS) e animais não protegidos (animal 1, 2, 3, 4, 5 e 6) do grupo vacinal SPL; o terceiro grupo foi composto de camundongos protegidos (animais 7 e 8) do grupo de vacinas SPL (**Figura 21 B**). Esses dados sugerem que a imunoassinatura pode ser usada para distinguir os animais protegidos de não protegidos, dentro e entre os grupos vacinados. Além disso, a tecnologia da imunoassinatura é suficientemente sensível para identificar diferenças sutis na resposta humoral de cada indivíduo que recebeu a mesma formulação vacinal.

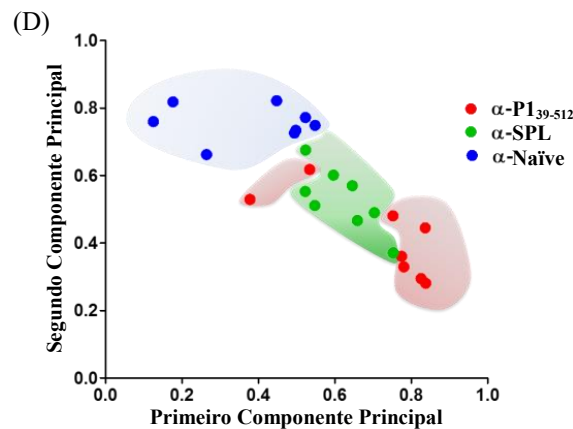


(B)



(C)





**Figura 21.** Imunoassinatura de camundongos submetidos à imunização com proteínas recombinantes P3C ou P1<sub>39-512</sub> por via intranasal. (A) Comparação da resposta imune IgG específica entre os animais protegidos e desprotegidos por grupos vacinais. (B) *Heatmap* demonstrando a imunoassinatura para IgG entre animais individuais imunizados com a região N-terminal ou C-terminal da proteína P1 de *S. mutans*. O teste T Student ( $P < 0,05$  com a Correção de Teste Múltiplo de Benjamini e Hochberg) por animais individuais imunizados com a proteína P1<sub>39-512</sub> e/ou P3C isoladamente ou co-administrado com adjuvante foi utilizado para selecionar peptídeos informativos. O agrupamento hierárquico usando a distância EUCLIDEAN foi usado como medida de similaridade para agrupar os peptídeos selecionados (eixo x) e grupo de vacinas (eixo y). A intensidade dos peptídeos é colorida onde o azul corresponde a baixa intensidade e vermelho a alta intensidade. Os números coloridos em vermelho representam animais não protegidos no grupo de vacinas P1<sub>39-512</sub> e em animais protegidos de azul do grupo de vacinas SPL. (C) Comparação da imunoassinatura entre animais protegidos e não protegidos do grupo vacinal imunizado com a proteína P1<sub>39-512</sub> sozinha usando CIM10K. *Scatterplot* da razão de mudança de dobra de animais agrupados por capacidade para controlar a colonização bacteriana em comparação com o grupo controle (Naïve). Peptídeos significativos com  $P < 0,05$  por teste-T foram utilizados para compor o gráfico. (D) A variância nas respostas imunes entre os grupos vacinais. Variação entre os animais de cada grupo vacinal para todas as sequências de peptídeos significativos na Análise de Componentes Principais (PCA), onde os dois primeiros componentes principais são plotados e separados por vacina. α-SPL: P1<sub>39-512</sub> + P3C + LTK63 grupo vacinal.

Na **figura 21 B** foi apresentado o *Heatmap* demonstrando a imunoassinatura para IgG entre animais individuais imunizados com a região N-terminal ou C-terminal da proteína P1 de *S. mutans*. O teste T Student ( $P < 0,05$  com a Correção de Teste Múltiplo de Benjamini e Hochberg) por animais individuais imunizados com a proteína P1<sub>39-512</sub> e/ou P3C isoladamente ou coadministrado com adjuvante foi utilizado para selecionar peptídeos informativos. O agrupamento hierárquico usando a distância EUCLIDEAN foi usado como medida de similaridade para agrupar os peptídeos selecionados (eixo x) e grupo de vacinas (eixo y). A intensidade dos peptídeos é colorida onde o azul corresponde a baixa intensidade e vermelho a alta intensidade. Os números coloridos em vermelho representam animais não protegidos no grupo de vacinas P1<sub>39-512</sub> e em animais protegidos de azul do grupo de vacinas SPL.

Em seguida, buscamos determinar a diferença na imunoassinatura entre animais protegidos e não protegidos do grupo vacinal P1<sub>39-512</sub>, considerando que este grupo imunizado foi o melhor para prevenir a colonização bacteriana. A comparação da mudança de dobra ( $> 1,5$  vezes) na intensidade de ligação dos anticorpos em relação ao grupo controle de peptídeos significativos é possível identificar que são dois conjuntos de peptídeos, um conjunto é maior

para animais com resposta imune protetora e outro para não protegidos (**Figura 21 C**). Ambos os grupos de camundongos compartilham 334 sequências de peptídeos em comum e o soro de animais protegidos reconhece 1,7 vezes o número de peptídeos que os não protegidos, uma pequena diferença na lista de peptídeos indicando que possivelmente a variância no efeito protetor não se deve a um número maior de regiões ou epítomos reconhecidos no antígeno alvo (dados não mostrados).

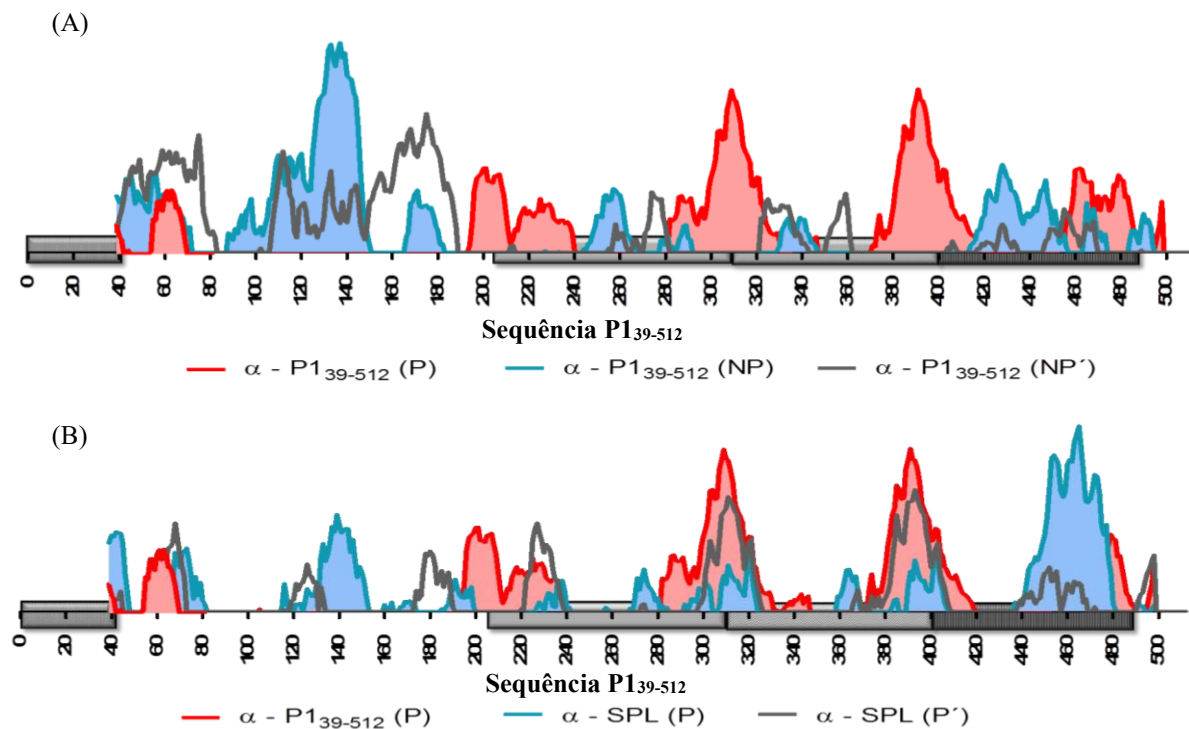
A análise da variância relativa entre os animais vacinados usando os peptídeos significativos selecionados pelos critérios de mudança de dobra superior a 1,5 vezes nos animais protegidos do grupo vacinal P1<sub>39-512</sub> resultou no agrupamento dos animais que receberam a mesma formulação vacinal (**Figura 21 D**). Podemos notar que os camundongos do grupo SPL estão entre o grupo controle e o grupo vacinal P1<sub>39-512</sub> e, notavelmente, os camundongos 4 e 5 (não protegidos) do grupo P1<sub>39-512</sub> estão distantes de animais protegidos e mais próximos do controle e do grupo SPL. Isso demonstra que a imunoassinatura pode separar animais imunizados intimamente relacionados com abordagens de vacina contra a cárie.

#### ***4.2.7 A imunoassinatura protetora conhecida pode ser usada para prever a eficácia da vacina contra cáries de animais individuais***

Tendo demonstrado que a imunoassinatura pode distinguir uma resposta imune de indivíduos intimamente relacionados e isso pode ser correlacionado com a proteção ou não no modelo desafio usando camundongos, questionamos se a tecnologia da imunoassinatura pode ser usada para prever o resultado após o desafio oral para cada animal, separando os animais não colonizados daqueles fortemente colonizados por *S. mutans*.

Ao usar a previsão de GuiTope, buscamos avaliar os epítomos reconhecidos por animais protegidos do grupo vacinal P1<sub>39-512</sub> e comparamos com o perfil dos camundongos não protegidos do mesmo grupo vacinal e camundongos protegidos do grupo vacinal SPL. Como esperado, a previsão do epítomo usando os únicos 180 peptídeos do grupo P1<sub>39-512</sub> (animais protegidos) mostrou que cinco regiões foram reconhecidas, uma no início da proteína P1, três dentro da região A e uma no final da região de ligação da saliva (SBR), que foi descrito anteriormente pelo nosso grupo e outros como o potencial sítio de ligação da saliva (**Figura 22**). Comparando as assinaturas entre animais não protegidos (número 4 ( $\alpha$ -P1<sub>39-512</sub> NP) e número 5 ( $\alpha$ -P1<sub>39-512</sub> NP') e camundongos protegidos, podemos notar que eles não compartilham uma alta homologia em seu perfil, após o que ambos os camundongos não

protegidos tinham maior grau de reconhecimento na região pré-A, mas não no final da porção N-terminal (**Figura 22 A**).



**Figura 22.** A imunoassinatura de IgG em matriz de peptídeos aleatórios utilizada para determinar a predição de epítipo entre cada grupo de vacina. Sequências de peptídeos significativos de animais não protegidos (A) ( $\alpha$ -P1<sub>39-512</sub>: os animais número 4 (NP) e 5 (NP')) e animais protegidos imunizados com P1<sub>39-512</sub> sozinhos e os animais protegidos (B) imunizados com P1<sub>39-512</sub> + P3C + LTK63 (SPL) ( $\alpha$ -SPL: os animais número 7 (SPL (P) e 8 (SPL (P')) foram submetidos à previsão do epítipo pelo software GuiTope e utilizando a sequência da proteína P1<sub>39-512</sub> como referência. Os peptídeos foram selecionados comparando o grupo vacinado com o grupo naíve usando soro individual no CIM10K usando um aumento mínimo de 1,5 vezes na imunização versus simulação e um valor de P inferior a 0,05. Para ambos os grupos de vacinas, o gráfico de linha representa o escore de previsão de GuiTope para cada aminoácido.

No entanto, comparando com os animais protegidos do grupo vacinal SPL (animal número 7 ( $\alpha$ -SPL P) e 8 ( $\alpha$ -SPL P')) é possível identificar várias regiões de alinhamento com os animais do grupo P1<sub>39-512</sub> com a assinatura protegida, incluindo epítipos no final da região N-terminal (**Figura 22 B**). Tomados em conjunto, os resultados demonstram que a tecnologia da imunoassinatura pode prever o resultado do desafio murino e é uma ferramenta potencial para determinar a eficácia das estratégias vacinais para o controle de cárie dental humana causada por *S. mutans*.

## **5 DISCUSSÃO**



## 5 DISCUSSÃO

Partindo do princípio de que a cárie dental é uma das doenças infecciosas que mais acometem os seres humanos (GUZMÁN-ARMSTRONG, 2005), sendo considerada a doença não contagiosa, NCD, mais comum do mundo e um dos maiores problemas da saúde pública mundial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015, 2017), todos os esforços envidados para eliminá-la são de importância fundamental. Em razão de que o *S. mutans* é apontado como o microrganismo mais cariogênico e predominante da cárie dental (SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009), pesquisas objetivando combatê-lo e erradicar essa doença devem ser incessantemente produzidas.

A Organização Mundial da Saúde recomenda estratégias de prevenção como orientação sobre os cuidados com saúde oral e dieta, incluindo o uso de flúor que devem ser universalmente acessíveis e disponibilizadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015, 2017). Nessa direção, a vacinação tem lugar de destaque por ser um método pouco dispendioso, de fácil distribuição, grande alcance social e eficaz no controle de doenças infecciosas.

Nas últimas quatro décadas, experimentos têm sido desenvolvidos para a produção de uma vacina eficiente contra a cárie dental humana, porém nenhum produto ainda se encontra disponível para uso em seres humanos. Em parte, o insucesso das estratégias pode ser atribuído às dificuldades encontradas na identificação de antígenos promissores e de qualidade a serem incorporados às formulações vacinais. Na verdade, a grande parte dos estudos está focada nas adesinas bacterianas, principalmente a P1, como alvo (LEHNER *et al.*, 1981; MICHALEK; KATZ; CHILDERS, 2001; SMITH; MATTOS-GRANER, 2008; SHIVAKUMAR; VIDYA; CHANDU, 2009). Contudo, recentes indagações estão surgindo sobre o potencial vacinal de outras proteínas de superfície menos exploradas. Nesse contexto, transportadores bacterianos da família dos ABC (*ATP Binding Cassete*) têm sido caracterizados como potenciais alvos devido ao importante papel que desempenham na fisiologia e virulência de microrganismos patogênicos (GARMORY; TITBALL, 2004).

A escolha feita por nós do uso do *B. subtilis* como veículo de entrega de antígenos, decorre de suas características peculiares e pelas quais tem sido utilizado amplamente, nos dias atuais, como sistema alternativo de expressão de proteínas heterólogas (PAULITZ; BÉLANGER, 2001; FERREIRA; FERREIRA; SCHUMANN, 2005). Ademais, pesquisas demonstraram que peptídeo derivado da proteína P1 foi expresso em altas concentrações em *B. subtilis*, acima dos níveis produzidos em *E. coli* apresentando características antigênicas e imunogênicas preservadas (McARTHUR *et al.*, 2007; TAVARES *et al.*, 2010).

Mesmo sendo uma via de administração recente, vários outros autores confirmaram a segurança e efetividade da imunização sublingual para indução da resposta imune protetora em compartimentos mucosos e sistêmicos (PARK, *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2016) corroborando os nossos resultados e razão de nossa escolha.

Os sistemas de transporte ABC desempenham um papel crucial na fisiologia e patogenicidade de diferentes espécies bacterianas e, portanto, têm sido testados como antígenos alvo para o desenvolvimento de vacinas. Estudos atuais realizados com esses transportadores em *S. mutans* se limitaram a sistemas envolvidos na captação de oligopeptídeos (NEPOMUCENO *et al.*, 2007), glutamato (KRASTEL *et al.*, 2010) e mais recentemente, fosfato inorgânico, ou Pst (FERREIRA *et al.*, 2016). Nos experimentos de Ferreira *et al.* (2016), os anticorpos séricos criados em camundongos imunizados com rPstS interferiram na adesão de bactérias à cavidade bucal de camundongos virgens desafiados com *S. mutans*. Da mesma forma, os camundongos ativamente imunizados com rPstS foram parcialmente protegidos da colonização oral após o desafio com a cepa *S. mutans* NG8. Esses resultados indicam que PstS de *S. mutans* é um potencial antígeno-alvo capaz de induzir respostas específicas e protetoras de anticorpos após administração sublingual.

Partindo do pressuposto que outros componentes do sistema de transporte ABC poderiam atuar como antígeno-alvo para imunoterapias e/ou profilaxia, como apontado por vários autores (TANGHE *et al.*, 1999; GARMORY; TITBALL, 2004; TANABE *et al.*, 2006; KRASTEL *et al.*, 2010), nos propusemos a estudar o aminoácido glutamato. Esse aminoácido em conjunto com a glutamina, possui papel central no metabolismo bacteriano e a deleção do óperon *gln* afeta a tolerância do *S. mutans* ao ambiente ácido (aciduricidade), um fator de virulência importante desse microrganismo para o desenvolvimento da doença cárie (KRASTEL *et al.*, 2010).

Em estudos prévios de nosso grupo sobre transportador de glutamato, a proteína GlnH de *S. mutans*, não se obteve sucesso em função de problemas no cultivo das culturas que demoravam a se replicar e não atingiam absorbâncias elevadas resultando em baixa expressão da proteína. Para superar esses problemas sintetizou-se os genes codificantes da proteína GlnH com duas principais modificações como descrito nos resultados: substituição das duas histidinas das posições 144e 145 por duas argininas no sítio de ligação ao substrato e adaptação do códon para expressão em *B. subtilis* por JCAT software, para reduzir a interferência desse com o metabolismo bacteriano e indução de maiores níveis da proteína.

No entanto, durante o experimento, observamos valores de peso molecular diferentes dos preditos para as proteínas recombinantes, *glnHco*, *nglnH* e *cglnH*, mais elevados, em gel

de SDS-PAGE. Duas possibilidades poderiam explicar o fenômeno: oligomerização proteica e retardo na mobilidade em gel devido à interação diferencial das proteínas com a matriz de poliacrilamida em função da composição de aminoácidos. Com o resultado do uso dos agentes redutores fortes (uréia 8 M e guanidina 6 M) descartou-se a oligomerização proteica. Adicionalmente, o teste de indução proteica em diferentes condições evidenciou a presença de apenas uma banda predominante de 70 kDa, observada tanto por coloração com *Comassie Blue* como com anticorpo específico, indicando que não houve influência no comportamento proteico e sim na quantidade de material induzido, reforçando a teoria de que a migração diferencial não é devida à oligomerização.

O fenômeno de migração diferencial observado para GlnHco, cGlnH e nGlnH pode ser explicado também pela interação dos resíduos de aminoácidos das proteínas com o gel de SDS-PAGE, em virtude de que, a predição do peso molecular é baseada apenas na composição de aminoácidos enquanto a migração eletroforética é dependente da combinação do peso e do tamanho molecular. Esse fato foi observado por alguns trabalhos principalmente em proteínas com alto conteúdo de resíduos de aminoácidos acídicos como o glutamato (E) e asparagina (D) embora a exata relação entre porcentagem desses aminoácidos e o peso molecular não estar bem estabelecida (LEE, *et al.*, 2013; GUAN, *et al.*, 2015). Tanto a proteína GlnH completa (GlnHco) quanto seus fragmentos (cGlnH e nGlnH) apresentam um conteúdo elevado desses resíduos com valores variando de 7,5% até 9,5%, sugerindo que a alteração da mobilidade em gel pode ser decorrente da alta hidrofobicidade e do conteúdo de aminoácidos da proteína.

Em função de que todas as proteínas (GlnHco, cGlnH e nGlnH) apresentaram mobilidade alterada em gel de poliacrilamida, mesmo após diferentes tratamentos, sem redução no peso molecular das mesmas, sugerindo que estas se encontram em monômeros e que possivelmente o fenômeno é decorrente da composição de aminoácidos das proteínas e interação desses com a matriz de poliacrilamida, fizemos a purificação somente da GlnHco.

Assim sendo, foi possível purificar a proteína GlnHco na fração 200 mM e na concentração de 76 ng/ $\mu$ l isenta de outras proteínas contaminantes e adequada para os ensaios posteriores. Após regime de imunização sublingual, observou-se um aumento na resposta IgG específica de GlnHco no soro de animais imunizados com a proteína, combinados ou não com o adjuvante. A presença do adjuvante aumentou a resposta imune induzida após a primeira dose, enquanto a proteína isolada induziu quantidades significativas de anticorpos no soro somente após a segunda dose. Os resultados demonstraram que a rGlnHco é altamente imunogênica para camundongos após administração via sublingual, resultando na indução de

resposta imune sistêmica específica estimulando níveis mais elevados da subclasse IgG1 indicando uma resposta imune tendendo para uma resposta tipo Th2 (humoral).

Os animais inoculados com bactérias incubadas com anticorpos gerados em camundongos imunizados com rGlnHco sozinha ou coadministrada com adjuvante LTK63 mostraram colonização bacteriana reduzida após 6 horas, com uma leve redução na colonização naqueles camundongos que receberam o soro de animais imunizados apenas com a proteína recombinante. Portanto, nossos resultados mostraram que os anticorpos criados com proteína isolada eram mais efetivos para neutralizar a ligação bacteriana à superfície dental dos camundongos, que os adjuvados sugerindo que a coadministração com o adjuvante utilizado pode impactar quantitativamente, mas não qualitativamente, a resposta imune. Podemos levantar o questionamento de que talvez outro adjuvante pudesse apresentar resultados melhores.

Observou-se, três semanas após a última dose, uma diminuição significativa no número de bactérias recuperadas da cavidade oral em camundongos imunizados com rGlnH sozinha ou coadministrada com o adjuvante ao serem submetidos à profilaxia oral e inoculados com *S. mutans*, em comparação com o grupo controle. Esses resultados apontam que a estratégia vacinal baseada na proteína GlnHco administrada via sublingual confere imunidade protetora à colonização oral por *S. mutans*. Por conseguinte, nossos resultados estão de acordo com os de Krastel *et al.* (2010) no sentido de que existe uma relação dinâmica entre a captação de glutamato e sobrevivência e persistência do *S. mutans* no biofilme da placa, e, segundo esse autor se daria devido aos efeitos dessa relação em dois importantes atributos de virulência de *S. mutans*, que são a produção de ácido e tolerância ao ácido.

Estudos realizados pelo nosso grupo têm demonstrado o potencial da proteína recombinante P1<sub>39-512</sub> (situada na região A da proteína P1, referida como região de ligação de saliva ou SBR), produzida e purificada a partir de linhagem recombinante de *B. subtilis* como um alvo em estratégias vacinais contra a cárie dental humana (TAVARES *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2014a; BATISTA *et al.*, 2014b). Entretanto, experimentos empregando outras porções da proteína P1 têm mostrado que a proteção não está restrita à região SBR (RHODIN *et al.*, 2004; McARTHUR *et al.*, 2007; SHI *et al.*, 2012). Adicionalmente, experimentos têm comprovado que o segundo sítio de ligação ao receptor salivar, SBR, situado na porção C-terminal, contido no fragmento denominado de P3C, usado como alvo é capaz de induzir anticorpos com maior capacidade de inibição da adesão bacteriana *in vitro* em comparação com a proteína recombinante P1 completa (HEIM *et al.*, 2014; ROBINETTE *et al.*, 2014).

Esses resultados nos impulsionaram a pesquisar estratégias vacinais utilizando o fragmento P3C da proteína P1 como alvo e, tanto quanto sabemos, nenhuma abordagem de vacina foi utilizada com ambos os sítios de ligação salivar como candidato alvo e/ou comparou o efeito inibidor de anticorpos criados por cada local de ligação. Portanto, neste trabalho nos propusemos a avaliar a imunogenicidade das estratégias de subunidade de vacina mucosa usando ambas as regiões de ligação salivares P1, isoladamente ou em associação, e comparar a funcionalidade de anticorpos no controle da colonização oral por *S. mutans*, em camundongos.

Desta forma, decidimos comparar o potencial das proteínas P3C e P1<sub>39-512</sub> isoladas, combinadas ou coadministradas com o adjuvante LTK63, como alvo vacinal para o controle da cárie dental, ou seja, avaliar se os dois antígenos isolados possuem características imunogênicas semelhantes e se seriam igualmente imunoprotetores. Além disso, aferir se a combinação deles poderia constituir o candidato vacinal "ideal" para o controle da cárie dentária, pois representam os dois locais de ligação da bactéria à saliva humana, impedindo que houvesse a adesão dos *S. mutans* à superfície dental.

A imunização intranasal com proteínas P3C e P1<sub>39-512</sub> isoladamente foi capaz de induzir níveis razoáveis de anticorpos IgG específicos após o regime vacinal e a coadministração com o adjuvante LTK63 em ambos os casos, aumentou significativamente a quantidade desses. Entretanto, a administração combinada de ambas as proteínas reduziu os anticorpos contra a proteína P1<sub>39-512</sub>, mas não os específicos para a P3C e, a coadministração com LTK63, restaurou, em parte, os níveis de anticorpos anti-P1<sub>39-512</sub> específicos e aumentou os contra a proteína P3C. Os resultados apontam no sentido de que a proteína P3C recombinante construída é capaz de estimular o sistema imunológico, mas, a associação de ambos os locais de ligação da saliva da proteína P1 é prejudicial para a resposta imune dirigida contra o sítio de ligação à saliva N-terminal, mas não para o C-terminal, além do que, a inclusão do adjuvante LTK63 é vantajosa para aumentar a resposta imune sistêmica contra as proteínas P3C e P1<sub>39-512</sub>. Assim, as proteínas P3C e P1<sub>39-512</sub> apresentaram imunogenicidade quando isoladas, que foi enfraquecida quando associadas, mas, expandida com a coadministração de adjuvante LT. Nossos resultados estão de acordo com os de Maeda *et al.* (2017) que comprovaram que, o adjuvante LT e sua subunidade B não tóxica, LTB, aumentaram tanto a magnitude como a especificidade das respostas de anticorpos à glicoproteína domínio III (EDIII) do vírus envelopado da dengue em camundongos imunizados com uma vacina anti-subunidade DENV. Além disso, esses autores, demonstraram que o LT e o LTB alteraram drasticamente os perfis de ligação aos epítomos de anticorpos IgG específicos para o EDIII.

Identificaram por análises de imunoassinaturas realizadas com microarranjos de peptídeos um epítipo localizado entre as alças EDIII EF e FG, que é especificamente reconhecido por anticorpos criados em camundongos imunizados com LT ou LTB, mas não por anticorpos criados em camundongos imunizados sem adjuvante ou com adjuvante de alumínio, confirmando a atuação positiva do adjuvante LT.

Lamentavelmente, nossos resultados, contrariamente aos obtidos por Robinette *et al.* (2014) *in vitro*, evidenciaram que os animais imunizados com proteína P3C isolada ou com adjuvante não foram capazes de induzir anticorpos protetores e tiveram um aumento na colonização bacteriana de 11,1%, quando isolada, e, de 2,1% quando coadministrada com adjuvante. Deste modo, anticorpos contra o segundo local de ligação, a região C-terminal, ajudou o patógeno a colonizar a cavidade bucal dos camundongos. Já a associação da P1<sub>39-512</sub> com a P3C apresentou redução bacteriana de 42% e quando coadministrada com adjuvante, 45%, demonstrando que a P1 completa apresentou melhores resultados que o fragmento P3C.

Os grupos vacinais que receberam a proteína P1<sub>39-512</sub> isolada ou coadministrada com o adjuvante LTK63 apresentaram os melhores resultados com uma redução na carga bacteriana na cavidade oral de camundongos de 83% e 69% respectivamente, em relação ao grupo controle (*mock*), deduzindo-se que a associação com o adjuvante LTK63 foi prejudicial, apresentando resultados piores.

Em estudo recente, Batista *et al.* (2017) avaliando a imunogenicidade, a eficácia protetora e as assinaturas imunológicas baseadas em peptídeos de anticorpos criados em camundongos após a imunização sublingual com uma forma recombinante da adesina P1 (P1<sub>39-512</sub>) de *S. mutans*, em combinação com o adjuvante de mucosa LTK4R observaram a indução de respostas imunológicas sistêmicas e de mucosa fortes e duradouras. Os resultados obtidos, por esse estudo anterior, estão em desacordo com os resultados deste trabalho, pois a incorporação do adjuvante naquele estudo, resultou num aumento da atividade anti-adesiva e anti-colonização contra *S. mutans*, conforme avaliação em condições *in vitro* e *in vivo*. A incorporação do adjuvante à formulação de vacina também alterou a especificidade do epítipo dos anticorpos induzidos, determinado por imunoassinaturas de soros colhidos de camundongos vacinados. O uso de uma biblioteca de microarranjos de peptídeos levou à identificação de alvos peptídicos reconhecidos por anticorpos em amostras de soro com efeitos anti-adesivos melhorados.

Sendo assim, nossos resultados apontaram a proteína P1<sub>39-512</sub> como um alvo potencial em estratégias vacinais contra a cárie dental humana confirmando trabalhos anteriores (TAVARES *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2014a; BATISTA *et al.*, 2014b), mas,

infelizmente, a expectativa de se conseguir um candidato vacinal excepcional para o controle da cárie dental humana, incidindo nos dois locais de ligação da bactéria à saliva, quando utilizamos a combinação das proteínas P3C e P1<sub>39-512</sub> em conjunto, não se concretizou.

A imunoassinatura é um método sensível para análise de coleção de anticorpos, empregando microarranjos de peptídeos e tem sido utilizada para classificação de mais de 40 diferentes doenças, tanto em humanos quanto em cães. Os resultados na utilização desse método demonstram uma precisão na classificação e previsão das doenças que excede 94% (HUGHES *et al.*, 2012; STAFFORD *et al.*, 2014). É um método tão sensível que pode individualizar diferentes doenças dentro de um mesmo órgão, como por exemplo, um câncer pancreático pode ser diferenciado de uma pancreatite e de um câncer pancreático num estágio inicial de desenvolvimento (KUKREJA; JOHNSTON; STAFFORD 2012), o que pode comprovar sua grande utilidade na detecção precoce do câncer, antes que ocorra a metástase, quando o tratamento é mais efetivo.

Assim também, foi demonstrado neste trabalho que a imunoassinatura pode distinguir resposta imune de indivíduos intimamente relacionados demonstrando que a tecnologia de imunoassinatura pode prever o resultado do desafio murino e é uma ferramenta potencial para determinar a eficácia das estratégias de vacinação para o controle da cárie dental humana causada por *S. mutans*.

## **6 CONCLUSÕES**



## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste trabalho pudemos concluir que:

- a imunização de camundongos com formulações vacinais, por via sublingual, contendo a proteína GlnH completa (rGlnHco) combinada com um adjuvante derivado da toxina termolábil (LT), induziu respostas imunológicas sistêmicas específicas capazes de controlar a adesão de *S. mutans* à superfície dental e levar à imunidade protetora à colonização oral por *S. mutans*. O adjuvante foi capaz de potencializar a resposta imunológica, mas não a neutralização da adesão bacteriana.
- estratégias vacinais, por via intranasal, induziram respostas imunológicas sistêmicas específicas para as subunidades da proteína P1, com níveis mais elevados para a P3C em comparação à P1<sub>39-512</sub>. A associação das duas proteínas mostrou-se deletéria e reduziu os níveis de anticorpos contra o sítio de ligação N-terminal, mas não contra a porção C-terminal. A resposta imune protetora foi observada apenas em animais imunizados com a proteína P1<sub>39-512</sub>, ao passo que os imunizados com a P3C, tiveram um discreto aumento na colonização de *S. mutans* ao serem comparados ao grupo controle. A adição do adjuvante teve impacto positivo na imunogenicidade dos antígenos, isoladamente ou quando combinados, e na redução da colonização bacteriana;
- os resultados demonstram que a associação das proteínas P1<sub>39-512</sub> e P3C não resultou em candidato vacinal compatível com o controle da cárie dental por *S. mutans*;
- foi possível avaliar diferenças entre os anticorpos gerados em diferentes animais, mesmo aqueles pertencentes ao mesmo grupo, e entre grupos usando a tecnologia de imunoassinatura de anticorpos frente a peptídeos sintéticos, como forma de prever a eficácia de vacinas derivadas da proteína P1 de *S. mutans*.

Esses resultados levantam perspectivas interessantes para o estudo de novos alvos vacinais a partir de formas recombinantes das proteínas GlnH e P1 de *S. mutans* e em sistema de expressão heterólogo baseado em linhagens de *B. subtilis*, por via intra nasal e sublingual. Os resultados indicam ainda que novas estratégias vacinais para o controle da cárie dental humana, causada por *S. mutans*, podem ser geradas. A análise das imunoassinaturas também poderá levar à identificação de alvos peptídicos reconhecidos por anticorpos em amostras de soro. Essa metodologia mostrou ser capaz de determinar a eficácia das estratégias de vacinação para o controle da cárie dental causada por *S. mutans*.

## **7 REFERÊNCIAS**

## 7 REFERÊNCIAS

1. AJDIĆ, D.; McSHAN, W. M.; McLAUGHLIN, R. E.; SAVIĆ, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; JIA, H.; LIN, S.; QIAN, Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B. A.; FERRETTI, J. J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.99, n.22, p. 14434-9, Out. 2002.
2. AMUGUNI, J. H.; LEE, S.; KERSTEIN, K. O.; BROWN, D. W.; BELITSKY, B. R.; HERRMANN, J. E.; KEUSCH, G. T.; SONENSHEIN, A. L.; TZIPORI, S. Sublingually administered *Bacillus subtilis* cells expressing tetanus toxin C fragment induce protective systemic and mucosal antibodies against tetanus toxin in mice. **Vaccine.** v. 29, n. 29-30, p. 4778-4784, Jun. 2011.
3. AMUGUNI, H.; TZIPORI, S. *Bacillus subtilis*: A temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. **Hum. Vaccin. Immunother.,** v. 8, p. 979-986, 2012.
4. ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPIZIZEN, J. Requirements for transformation in bacillus subtilis. **J. Bacteriol.**v.81, n.5, p.741-6, May 1961.
5. ARMSTRONG, M. E.; LAVELLE, E. C.; LOSCHER, C. E.; LYNCH, M. A.; MILLS, K. H. Proinflammatory responses in the murine brain after intranasal delivery of cholera toxin: implications for the use of AB toxins as adjuvants in intranasal vaccines. **J. Infect. Dis.,** v. 192, p. 1628-1633, 2005.
6. BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Front. Biosci.** v.1, n.9, p.1267-77, May 2004.
7. BATISTA, M. T.; FERREIRA, E. L.; PEREIRA, G. D. S.; STAFFORD, P.; MAEDA, D. L. N. F.; RODRIGUES, J. F.; BRADY, L. J.; JOHNSTON, S. A.; FERREIRA, L. C. D. S.; FERREIRA, R. D. C. C. LT adjuvant modulates epitope specificity and improves the efficacy of murine antibodies elicited by sublingual vaccination with the N-terminal domain of *Streptococcus mutans* P1. **Vaccine.** v. 35, n. 52, p. 7273-7282, Dec. 2017.
8. BATISTA, M. T.; SOUZA, R. D.; PACCEZ, J. D.; LUIZ, W. B.; FERREIRA, E. L.; CAVALCANTE, R. C.; FERREIRA, R. C.; FERREIRA, L. C. Gut adhesive *Bacillus subtilis* spores as a platform for mucosal delivery of antigens. **Infect Immun.** v.82, n.4, p. 1414-23, Apr. 2014a.
9. BATISTA, M. T.; SOUZA, R. D.; FERREIRA, E. L.; ROBINETTE, R.; CROWLEY, P. J.; RODRIGUES, J. F.; BRADY, L. J.; FERREIRA, L. C.; FERREIRA, R. C.

Immunogenicity and in vitro and in vivo protective effects of antibodies targeting a recombinant form of the *Streptococcus mutans* P1 surface protein. **Infect Immun.** v.82, n.12, p.4978-88, Dec. 2014b.

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

11. BOWEN, W. H. Dental diseases in primates. **Proc. R. Soc. Med.** v. 62, n. 12, p.1295, Dec. 1969.

12. BRADY, L. J.; CROWLEY, P. J.; MA, J. K.; KELLY, C.; LEE, S. F.; LEHNER T.; BLEIWEIS, A. S. Restriction fragment length polymorphisms and sequence variation within the spaP gene of *Streptococcus mutans* serotype c isolates. **Infect Immun.** v. 59, n. 5, p. 1803-10, May 1991.

13. BRADY, L. J.; MADDOCKS, S. E.; LARSON, M. R.; FORSGREN, N.; PERSSON, K.; DEIVANAYAGAM, C. C.; JENKINSON, H. F. The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. **Mol. Microbiol.** v. 77, n. 2, p. 276-86, Jul. 2010.

14. CCAHUANA-VÁSQUEZ, R. A.; CURY, J. A. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. **Braz. Oral Res.** v. 24, n. 2, p. 135-41, Apr.-Jun. 2010.

15. CHASE, B. A.; JOHNSTON, S. A.; LEGUTKI, J. B. Evaluation of biological sample preparation for immunosignature-based diagnostics. **Clin. Vaccine Immunol.** v.19, p. 352–358, 2012.

16. DASSA, E. ABC transport. Em: **Encyclopedia of microbiology.** New York: **Academic Press.** v.1, p. 1-12, 2000.

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

18. FERREIRA, L. C.; FERREIRA, R. C.; SCHUMANN, W. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. **An. Acad. Bras. Cienc.** v. 77, n.1, p. 113-24, Mar. 2005.

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

20. FISCHETTI, V. A.; PANCHOLI, V.; SCHNEEWIND, O. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. **Mol. Microbiol.** v. 4, n. 9, p. 1603-5, Sept. 1990.
21. GARMORY, H. S.; TITBALL, R. W. ATP-Binding Cassette Transporters Are Targets for the Development of Antibacterial Vaccines and Therapies. **Infect Immun.** v. 72, n. 12, p. 6757-63, Dec. 2004.
22. GUAN, Y.; ZHU, Q.; HUANG, D.; ZHAO, S.; JAN, L. O. L.; PENG, J. An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. **Sci Rep.** v. 27, n. 5, p. 13370, Aug. 2015.
23. GUZMÁN-ARMSTRONG, S. Rampant caries. **J. Sch. Nurs.** n. 21, n. 5, p. 272–278, Oct. 2005.
24. HALPERIN, R. F.; STAFFORD, P.; EMERY, J. S.; NAVALKAR, K. A.; JOHNSTON, S. A. GuiTope: an application for mapping random-sequence peptides to protein sequences. **BMC Bioinformatics.** v. 13, p. 1, 2012.
25. HAMADA, S.; SLADE H. D. Biology, immunology and carcinogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Review.** v. 44, n. 2, p. 331-384, 1980.
26. HARWOOD, C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends Biotechnol.** v. 10, n. 7, p. 247-56, Jul. 1992.
27. HASHIMOTO, K.; PANCHENKO, A. R. Mechanisms of protein oligomerization, the critical role of insertions and deletions in maintaining different oligomeric states. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 107, n. 47, p. 20352-7, Nov. 2010.
28. HEIM, K. P.; CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J. An intramolecular interaction involving the N terminus of a streptococcal adhesin affects its conformation and adhesive function. **J. Biol. Chem.** v. 288, n. 19, p. 13762-74, May 2013.
29. HEIM, K. P.; CROWLEY, P. J.; LONG, J. R.; KAILASAN, S.; MCKENNA, R.; BRADY, L. J. An intramolecular lock facilitates folding and stabilizes the tertiary structure of *Streptococcus mutans* adhesin P1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 111, n. 44, p. 15746-51, Nov. 2014.
30. HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Ann. Rev. Cell Biol.** v. 8, p. 67-113, 1992.
31. HIGGINS, C.F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. **Res. Microbiology.** v. 152, n. 3-4, p. 205-210, Apr.-May 2001.
32. HUANG, Y.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M. Induction of protective immunity against *Streptococcus mutans* colonization after mucosal immunization with

- attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing an *S. mutans* adhesin under the control of in vivo-inducible nirB promoter. **Infect Immun.** v. 69, n. 4, p. 2154-61, Apr. 2001.
33. HUGHES, A. K.; CICHACZ, Z.; SCHECK, A.; COONS, S. W.; JOHNSTON, S. A.; STAFFORD, P. Immunosignaturing can detect products from molecular markers in brain cancer. **PLoS ONE** 7, e40201 (2012).
34. JENKINSON, H. F.; LAMONT, R. J. Streptococcal adhesion and colonization. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.** v. 8, n. 2, p. 175-200, 1997.
35. JHA, S. K.; MARQUSEE, S. Kinetic evidence for a two-stage mechanism of protein denaturation by guanidinium chloride. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 111, n. 13, p. 4856-61, Apr. 2014.
36. JONES, S.; THORNTON, J. M. Protein-protein interactions: a review of protein dimer structures. **Prog. Biophys. Mol. Biol.** v. 63, n. 1, p. 31-65, 1995.
37. JOHNSTON, S. A.; THAMM, D. H.; LEGUTKI, J. B. The immunosignature of canine lymphoma: characterization and diagnostic application. **BMC Cancer.** v. 14, p. 657, 2014.
38. KAKESHITA, H.; KAGEYAMA, Y.; ENDO, K.; TOHATA, M.; ARA, K.; OZAKI, K.; NAKAMURA, K. Secretion of biologically-active human interferon- $\beta$  by *Bacillus subtilis*. **Biotechnol. Lett.** v. 33, n. 9, p. 1847-52, Sep. 2011.
39. KOGA, T.; YAMASHITA, Y.; NAKANO, Y.; KAWASAKI, M.; OHO, T.; YU, H.; NAKAI, M.; OKAHASHI, N. Surface proteins of *Streptococcus mutans*. **Dev. Biol. Stand.** v. 85, p. 363-9, 1995.
40. KOGA, T.; OHO, T.; SHIMAZAKI, Y.; NAKANO, Y. Immunization against dental caries. **Vaccine.** v. 20, n. 16, p. 2027-44, May 2002.
41. KRASTEL, K., DILANI, B. S., 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. **J. Bacteriol.** v. 192, n. 4, p. 984-93, Feb. 2010.
42. KUKREJA, M.; JOHNSTON, S. A.; STAFFORD, P. Comparative study of classification algorithms for immunosignaturing data. **BMC Bioinformatics.** v. 13, p. 139, 2012.
43. LARSON, M. R.; RAJASHANKAR, K. R.; CROWLEY, P. J.; KELLY, C.; MITCHELL, T. J.; BRADY, L. J.; DEIVANAYAGAM, C. Crystal structure of the C-

- terminal region of *Streptococcus mutans* antigen I/II and characterization of salivary agglutinin adherence domains. **J. Biol. Chem.** v. 286, n. 24, p. 21657-66, June 2011.
44. LARSON, M. R.; RAJASHANKAR, K. R.; PATEL, M. H.; ROBINETTE, R. A.; CROWLEY, P. J.; MICHALEK, S.; BRADY, L. J.; DEIVANAYAGAM, C. Elongated fibrillar structure of a streptococcal adhesin assembled by the high-affinity association of alpha- and PPII-helices. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 107, n. 13, p. 5983-8, Mar. 2010.
45. LEE, S.; BELITSKY, B. R.; BRINKER, J. P.; KERSTEIN, K. O.; BROWN, D. W.; CLEMENTS, J. D.; KEUSCH, G. T.; TZIPORI, S.; SONENSHEIN, A. L.; HERRMANN, J. E. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 17, p. 1647-1655, 2010a.
46. LEE, S.; BELITSKY, B. R.; BROWN, D. W.; BRINKER, J. P.; KERSTEIN, K. O.; HERRMANN, J. E.; KEUSCH, G. T.; SONENSHEIN, A. L.; TZIPORI, S. Efficacy, heat stability and safety of intranasally administered *Bacillus subtilis* spore or vegetative cell vaccines expressing tetanus toxin fragment C. **Vaccine.** v. 28, p. 6658-6665, 2010b.
47. LEGUTKI, J. B.; JOHNSTON, S. A. Immunosignatures can predict vaccine efficacy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 110, p. 18614-18619, 2013.
48. LEGUTKI, J. B.; MAGEE, D. M.; STAFFORD, P.; JOHNSTON, S. A. A general method for characterization of humoral immunity induced by a vaccine or infection. **Vaccine.** n. 28, p. 4529-4537, 2010.
49. LEHNER, T.; CHALLACOMBE, S. J.; CALDWELL, J. Oral immunization with *Streptococcus mutants* in rhesus monkeys and the development of immune response and dental caries. **Immunology.** v. 41, n. 4, p. 857-64, Dec. 1980.
50. LEHNER, T.; RUSSELL, M. W.; CALDWELL, J.; SMITH, R. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. **Infect. Immun.** v. 34, n. 2, p. 407-15, Nov. 1981.
51. LEHNER, T. **Immunology of oral diseases.** 3rd ed. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1992.
52. LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.** v. 50, n. 4, p. 353-80, Dec. 1986.
53. MA, J. K.; LEHNER, T. Prevention of colonization of *Streptococcus mutans* by topical application of monoclonal antibodies in human subjects. **Arch. Oral Biol.** v. 35 Suppl., p. 115S-122S, 1990.
54. MA, J. K.; HIKMAT, B. Y.; WYCOFF, K.; VINE, N. D.; CHARGELEGUE, D.; YU, L.; HEIN, M. B.; LEHNER, T. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory

- antibody and preventive immunotherapy in humans. **Nat. Med.** v. 4, n. 5, p. 601-6, May 1998.
55. MAEDA, D. L. N. F.; BATISTA, M. T.; PEREIRA, L. R.; CINTRA, M. J.; AMORIN, J. H.; MATHIAS-SANTOS, C.; PEREIRA, S. A.; BOSCARDIN, S. B.; SILVA, S. R.; FAQUIM-MAURO, E. L.; SILVEIRA, V. B.; OLIVEIRA, D. B. L.; JOHNSTON, S. A.; FERREIRA, L. C. S.; RODRIGUES, J. F. Adjuvant-mediated epitope specificity and enhanced neutralizing activity of antibodies targeting dengue virus envelope protein. **Frontiers in Immunol.** v. 8, p. 1-13, Sept. 2017.
56. McARTHUR, W. P.; RHODIN, N. R.; SEIFERT, T. B.; OLI, M. W.; ROBINETTE, R. A.; DEMUTH, D. R.; BRADY, L. J. Characterization of epitopes recognized by anti-*Streptococcus mutans* P1 monoclonal antibodies. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 50, n. 3, p. 342-53, Aug. 2007.
57. MEIMA, R.; VAN DIJL, J. M.; BRON, S. Expression systems in *Bacillus*. In: Baneyx, François. **Protein Expression Technologies**. 1st ed. Norfolk: Horizon Bioscience, p. 199-252, 2004.
58. MICHALEK, S. M.; KATZ, J.; CHILDERS, N. K. A vaccine against dental caries: an overview. **BioDrugs**. v. 15, n. 8, p. 501-8, 2001.
59. MILLER, S.; LESK, A. M.; JANIN, J.; CHOTHIA, C. The accessible surface area and stability of oligomeric proteins. **Nature**. v. 328, n. 6133, p. 834-6, Aug.-Sep. 1987.
60. NAKAI, M.; OKAHASHI, N.; OHTA, H.; KOGA, T. Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. **Infect Immun.** v. 61, n. 10, p. 4344-9, Oct. 1993.
61. NGUYEN, H. D.; PHAN, T. T.; SCHUMANN, W. Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Curr. Microbiol.**, v. 55, p. 89-93, 2007.
62. NEPOMUCENO, R. S.; TAVARES, M. B.; LEMOS, J. A.; GRISWOLD, A. R.; RIBEIRO, J. L.; BALAN, A.; GUIMARÃES, K. S.; CAI, S.; BURNE, R. A.; FERREIRA, L. C.; FERREIRA, R. C. The oligopeptide (opp) gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence, and characterization. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 22, n. 4, p. 277-84, Aug. 2007.
63. NOBBS, A. H.; LAMONT, R. J.; JENKINSON, H. F. *Streptococcus* adherence and colonization. **Microbiol. Mol. Bio.l Rev.** v. 73, n. 3, p. 407-50, Sep. 2009.



64. O'DONNELL, B.; MAURER, A.; PAPANDREOU-SUPPAPPOLA, A.; STAFFORD, P. Time-Frequency Analysis of Peptide Microarray Data: Application to Brain Cancer Immunosignatures. **Cancer Inform.** v. 14, p. 219–233, 2015.
65. PACCEZ, J. D.; NGUYEN, H. D.; LUIZ, W. B.; FERREIRA, R. C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; SCHUMAN, W.; FERREIRA, L. C. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. **Vaccine.** v. 25, n. 24, p. 4671-80, June 2007.
66. PARK, H-J.; FERCO, B.; BYUN, Y-H.; SONG, J-H.; HAN, G-Y.; ROETHL, E.; EGOROV, A.; MUSTER, T.; SEONG, B.; KWEON, M-N.; SONG, M.; CZERKINSKY, C.; NGUYEN, H. Sublingual immunization with a live attenuated influenza a virus lacking the nonstructural protein 1 induces broad protective immunity in mice. **PLoS ONE | [www.plosone.org](http://www.plosone.org)**. v. 7, issue 6, p. 1-10, June 2012.
67. PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annu. Rev. Phytopathol.** v. 39, p. 103-33, 2001.
68. PETERSEN, R. E.; BOURGEOIS, D.; OGAWA, H.; ESTUPINAN-DAY, S.; NADIAYE, C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull. World Health Organ.** v. 83, n. 9, p. 661-9, Sep. 2005.
69. PHAN, T. T.; NGUYEN, H. D.; SCHUMANN, W. Novel plasmid-based expression vectors for intra- and extracellular production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Protein Expr. Purif.** v. 46, n. 2, p. 189-95, Apr. 2006.
70. POOLMAN, B.; SMID, E. J.; KONINGS, W. N. Kinetic properties of a phosphate-bond-driven glutamate-glutamine transport system in *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. **J. Bacteriol.** v. 169, n. 6, p. 2755-61, June 1987.
71. PRAKOBPHOL, A.; XU, F.; HOANG, V. M.; LARSSON, T.; BERGSTROM, J.; JOHANSSON, I.; FRÄNGSMYR, L.; HOLMSKOV, U.; LEFFLER, H.; NILSSON, C.; BOREN, T.; WRIGHT, J.; STRÖMBERG, N.; FISHER, S. J. Salivary agglutinin, which binds *Streptococcus mutans* and *Helicobacter pylori*, is the lung scavenger receptor cysteine-rich protein gp-340. **J. Biol. Chem.** v. 275, n. 51, p. 39860-6, Dec. 2000.
72. RESTREPO, L.; STAFFORD, P.; JOHNSTON, S. A. Feasibility of an early Alzheimer's disease immunosignature diagnostic test. **J. Neuroimmunol.** v. 254, p. 154–160, 2013.
73. RHODIN, N. R.; VAN TILBURG, M. L.; OLI, M. W.; McARTHUR, W. P.; BRADY, L. J. Further characterization of immunomodulation by a monoclonal antibody against *Streptococcus mutans* antigen P1. **Infect. Immun.** v. 72, n.1, p. 13-21, Jan. 2004.

74. ROBINETTE, R. A.; HEIM, K. P.; OLI, M. W.; CROWLEY, P. J.; McARTHUR, W. P.; BRADY, L. J. Alterations in immunodominance of *Streptococcus mutans* AgI/II: lessons learned from immunomodulatory antibodies. **Vaccine**. v. 32, n. 3, p. 375-82, Jan. 2014.
75. RODRIGUES, J. F.; MATHIAS-SANTOS, C.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; AMORIM, J. H.; CABRERA-CRESPO, J.; BALAN, A.; FERREIRA, L. C. Functional diversity of heat-labile toxins (LT) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*: differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) AND LT4 (pLT). **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 5222-5233, 2011.
76. RUSSELL, M. W.; LEHNER, T. Characterisation of antigens extracted from cells and culture fluids of *Streptococcus mutans* serotype C. **Arch. Oral Biol.** v. 23, n. 1, p. 7-15, 1978.
77. RUSSELL, M. W. Analysis of heart-reactive antibodies induced in rabbits by immunization with *Streptococcus mutans*. **J. Oral. Pathol.** v. 16, n. 5, p. 234-40, May 1987.
78. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. Nova York, Cold Sping Harbour, Laboratory Press, 2001.
79. SENPUKU, H.; IIZIMA, T.; KOGA, T.; NISIZAWA, T. Identification of human antigenic epitopes in an alanine-rich repeating region using sera from hu-PBL-SCID mice immunized with a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiol. Immunol.** v. 11, n. 5, p. 343-9, Oct. 1996.
80. SHI, W.; LI, Y. H.; LIU, F.; YANG, J. Y.; ZHOU, D. H.; CHEN, Y. Q.; ZHANG, Y.; YANG, Y.; HE, B. X.; HAN, C.; FAN, M. W.; YAN, H. M. Flagellin enhances saliva IgA response and protection of anti-caries DNA vaccine. **J. Dent. Res.** v. 91, n. 3, p. 249-54, Mar. 2012.
81. SHIM, B-S.; CHOI, Y.; CHEON, I. S.; SONG, M. K. Sublingual Delivery of Vaccines for the Induction of Mucosal Immunity. **Immune Network**. v. 13, n. 3, p. 81-85, June 2013
82. SHIVAKUMAR, K. M.; VIDYA, S. K.; CHANDU, G. N. Dental caries vaccine. **Indian J. Dent. Res.** v. 20, n. 1, p. 99-106, Jan.-Mar. 2009.
83. SMITH, D. J.; MATTOS-GRANER, R. O. Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** v. 319, p. 131-56, 2008.
84. STAFFORD, P.; HALPERIN, R.; LEGUTKI, J. B.; MAGEE, D. M.; GALGIANI, M.; JOHNSTON, S. A. Physical characterization of the 'immunosignaturing effect'. **Mol. Cell Proteomics** 11, M111.011593, 2012.

85. STAFFORD, P.; CICHACZ, Z.; WOODBURY, N. W.; JOHNSTON, S. A. Immunosignature system for diagnosis of cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **111**, E3072–3080, 2014.
86. SUN, D.; JESSEN S.; LIU, C.; LIU, X.; NAJMUDIN, S.; GEORGIADIS, M. M. Cloning, expression, and purification of a catalytic fragment of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase: Crystallization of nucleic acid complexes. **Protein Sci.** v. 7, n. 7, p. 71575-1582, Jul. 1998.
87. SYKES, K. F.; LEGUTKI, J. B.; STAFFORD, P. Immunosignaturing: a critical review. **Trends Biotechnol.** v. 31, p. 45–51, 2013.
88. TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. **J. Dent. Res.**, v. 90, p. 294-303, 2011.
89. 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. **Infect. Immun.** v. 74, n. 6, p. 3687-91, June 2006.
90. TANGHE, A.; LEFÈVRE, P.; DENIS, O.; D'SOUZA, S.; BRAIBANT, M.; LOZES, E.; SINGH, M.; MONTGOMERY, D.; CONTENT, J.; HUYGEN, K. Immunogenicity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccines encoding putative phosphate transport receptors. **J. Immunol.** v. 162, n. 2, p. 1113-9, Jan. 1999.
91. TAUBMAN, M. A.; NASH, D. A. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. **Nat. Rev. Immunol.** v. 6, n. 7, p. 555-63, July 2006.
92. TAVARES, M. B.; SILVA, B. M.; CAVALCANTE, R. C.; SOUZA, R. D.; LUIZ, W. B.; PACCEZ, J. D.; CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; FERREIRA, L. C.; FERREIRA, R. C. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of *Streptococcus mutans* P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 59, n. 2, p. 131-42, July 2010.
93. TON-THAT, H.; MARRAFFINI, L. A.; SCHNEEWIND, O. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1694, n. 1-3, p. 269-78, Nov. 2004.
94. TROESCHEL, S. C.; THIES, S.; LINK, O.; REAL, C. I.; KNOPS, K.; WILHELM, S.; ROSENAU, F.; JAEGER, K. E. Novel broad host range shuttle vectors for expression in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida*. **J. Biotechnol.** v. 161, n. 2, p. 71-9, Oct. 15 2012.

95. TSUHA, Y.; HANADA, N.; ASANO, T.; ABEI, T.; YAMAGUCHI, S.; SALAM, M. A.; NAKAO, R.; TAKEUCHI, H.; KUROSAKI, N.; SENPUKU, H. Role of peptide antigen for induction of inhibitory antibodies to *Streptococcus mutans* in human oral cavity. **Clin. Exp. Immunol.** v. 137, n. 2, p. 393-401, Aug. 2004.
96. WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. Bacillus subtilis as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1694, n. 1-3, p. 299-310, Nov. 2004.
97. World Health Organization (WHO). Disponível em: <[http://www.who.int/oral\\_health/en/](http://www.who.int/oral_health/en/)>. Acesso em: 03 dez. 2015.
98. World Health Organization (WHO). Sugar and dental caries. WHO TECHNICAL INFORMATION NOTE. Disponível em: <[http://www.who.int/oral\\_health/publications/en/](http://www.who.int/oral_health/publications/en/)>. Acesso em: 15 abril 2017.
99. WU, H. Y.; RUSSELL, M. W. Immunological cross-reactivity between *Streptococcus mutans* and human heart tissue examined by cross-immunization experiments. **Infect. Immun.** v. 58, n. 11, p 3545-52, Nov. 1990.
100. XUE, G.; JOHNSON, J. S.; DALRYMPLE, B. P. High osmolarity improves the eletro-transformation efficiency of the gram-positive bactéria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. **J. Microbiol. Methods.** v. 34, p. 183–191, 1999.