

GI SELA 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

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. 98 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 P1₁₃₉₋₅₁₂ 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 P1₃₉₋₅₁₂ 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 P1₃₉₋₅₁₂, 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 P1₃₉₋₅₁₂. 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. 98 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 P1₃₉₋₅₁₂ 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 P1₃₉₋₅₁₂ 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 P1₃₉₋₅₁₂ 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 P1₃₉₋₅₁₂. 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.

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 patogênia 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).

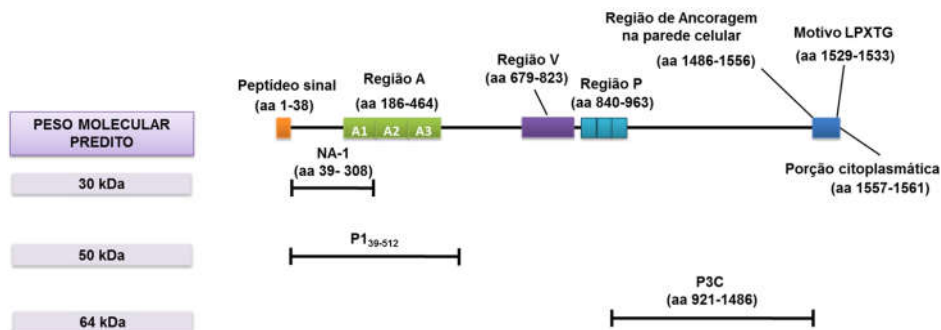


Figura 1. Representação esquemática dos fragmentos derivados da proteína P1 (NA-1, P1₃₉₋₅₁₂ e P3C). Organização estrutural da proteína P1 completa e regiões importantes destacadas. Peso molecular predito de cada derivado proteico da proteína P1 à esquerda. Fonte: Adaptado de HEIM *et al.*, 2014.

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 α -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 P1₃₉₋₅₁₂, 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 P1₃₉₋₅₁₂ 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 P1₃₉₋₅₁₂, 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 íntima 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).

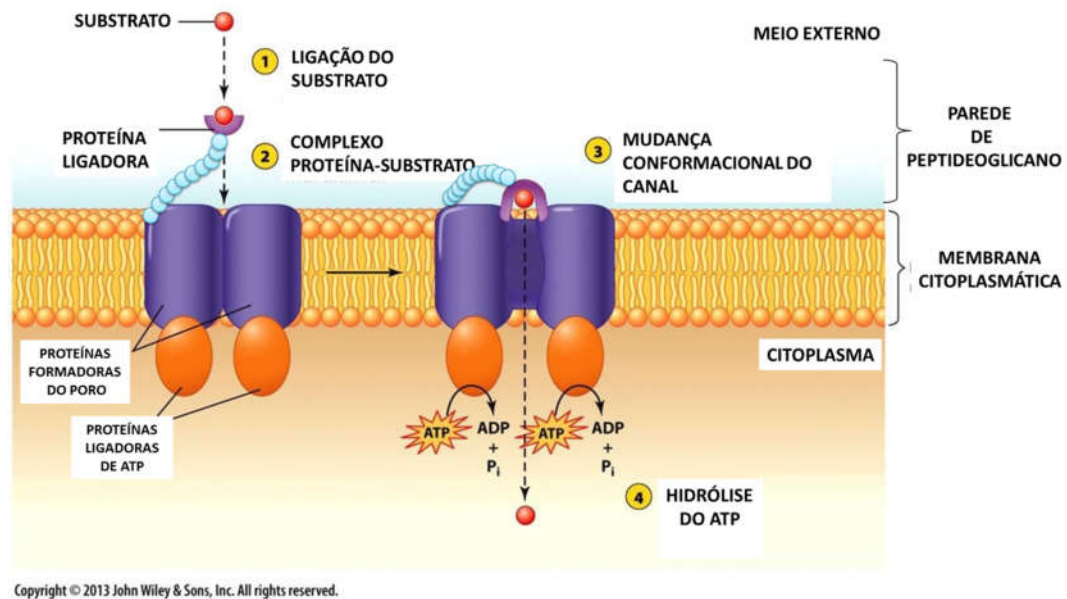


Figura 2. Organização típica de transportadores ABC em bactérias Gram-positivas. A proteína ligadora interage especificamente com o substrato, formando o complexo proteína ligadora-substrato. As proteínas transmembrânicas formam o canal pelo qual o substrato será transportado para dentro da célula. O 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⁺ 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*.

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 termo-lábil (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 P1₃₉₋₅₁₂. 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 P1₃₉₋₅₁₂, 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 P1₃₉₋₅₁₂ 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- β 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. Biol. 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. 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.; BORÉN, 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/>. 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/>. 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.