

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

NATÁLIA LEAL VIZOTO

INFLUENCIA DO REGULADOR CovR NA RESPOSTA DE  
*Streptococcus mutans* AO CONTATO COM SALIVA E SANGUE.

Dissertação de mestrado  
apresentada a Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba da  
UNICAMP para obtenção do  
título de mestre em Biologia  
Buco-Dental, na Área de  
Microbiologia e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS  
GRANER

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE/DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELO ALUNO, E ORIENTADA PELO PROF.DR. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS-GRANER



Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
GARDÊNIA BENOSSI – CRB8/8644 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

V83i Vizoto, Natália Leal, 1982-  
Influência do regulador CovR na resposta de Streptococcus mutans ao contato com saliva e sangue / Natalia Leal Vizoto. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Renata de Oliveira Mattos-Graner.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Regulação da expressão gênica. 2. Cárie dentária. 3. Fatores de virulência. I. Mattos-Graner, Renata de Oliveira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Influence of the CovR regulator in Streptococcus mutans response to contact with saliva and blood

**Palavras-chave em Inglês:**

Gene expression regulation

Dental caries

Virulence factors

**Área de concentração:** Microbiologia e Imunologia

**Titulação:** Mestre em Biologia Buco-Dental

**Banca examinadora:**

Renata de Oliveira Mattos-Graner [Orientador]

Silvana Cai

Flávia Sammartino Mariano Rodrigues

**Data da defesa:** 01-07-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 01 de Julho de 2011, considerou a candidata NATALIA LEAL VIZOTO aprovada.

Handwritten signature of Prof. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner in blue ink.

Profa. Dra. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

Handwritten signature of Prof. Dra. Silvana Cai in black ink.

Profa. Dra. SILVANA CAI

Handwritten signature of Prof. Dra. Flávia Sammartino Mariano Rodrigues in blue ink.

Profa. Dra. FLÁVIA SAMMARTINO MARIANO RODRIGUES

**Dedico este trabalho a toda minha família, da qual subtraí momentos preciosos, e especialmente aos meus pais Luiz Carlos e Márcia e minha querida irmã, Mariana. Vocês são responsáveis pela existência e alegria de toda nossa família. Obrigada por tudo.**

*“Admiramos o mundo através do que amamos”*

*(Lamartine)*

## AGRADECIMENTOS

À DEUS o meu muito obrigada, pois grandes foram as lutas, os momentos de tensão não foram poucos e houve tempos nos quais as dificuldades pareciam insuperáveis. Muitas vezes desistir parecia o melhor caminho, mas o Senhor esteve sempre presente, tornando-me perseverante. Obrigada por tudo.

À Universidade Estadual de Campinas, e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba que me acolheu e possibilitou desenvolver meus estudos voltados à microbiota bucal.

Ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba e a secretaria do curso de Pós-Graduação pela colaboração auxiliando nos procedimentos acadêmicos formais.

Aos voluntários desta pesquisa pela compreensão de dias e dias de dedicação, proporcionando a realização desta pesquisa. Obrigada pela dedicação e amizade.

Aos examinadores que compuseram a banca da tese Flávia S. Mariano Rodrigues e Silvana Cai pela análise, avaliação e colaboração nesse trabalho.

Aos examinadores que compuseram a banca suplente Érika Harth Chú e Márcia Pinto Alves Mayer.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata de Oliveira Mattos-Graner por ter me recebido em seu laboratório, pelo apoio, conselhos e enorme paciência e compreensão. Obrigada por toda sua dedicação em nossos experimentos e relatórios, e principalmente nossas conversas onde recebi muitos conhecimentos.

Ao Professor da Área de Microbiologia e Imunologia Prof. Dr. José Francisco Höfling, o qual foi o meu primeiro contato na Faculdade de Odontologia e que me incentivou e incentiva em todos os momentos da minha carreira. Muito obrigada.

Aos professores doutores Prof. Dr. Edgar Graner e Prof. Dr. Ricardo Della Coletta e aos alunos da pós-graduação pela atenção e pelo espaço proporcionado nas instalações laboratoriais na área de Patologia, do Departamento de Diagnóstico Oral.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (em ordem alfabética) Andressa Venturini, Cristiane Duque, Érika Hart Chú, Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, Ítalo Sarto Rodrigues, Iza Teixeira Alves Peixoto, Janaína de Cássia Orlandi Sardi, Julianna Joanna de Carvalho Moraes, Paula Cristina Aníbal, Rafael Nóbrega Stipp, Regianne Umeko Kamiya, Sérgio Eduardo Braga da Cruz, Tiago Taiete e Thaís Rossini de Oliveira por terem feito parte do meu aprendizado.

À Funcionária Wilma Ferraz, do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba pela amizade, apoio e carinho concedido em todos os momentos da minha caminhada e principalmente me dando forças nos momentos em que mais precisei.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro que viabilizou a execução do projeto de pesquisa.

Aos meus amigos em especial a Ana Carolina Kairalla, Cristiane Duque, Erika Hart Chú, Giovana Campos, José Eduardo Guercio (meu querido professor de Inglês), Marcela Angeli, Renata Andrade, Renato Telles, Polyanne, Sônia Delfino de Souza, enfim àqueles a quem tenho um imenso carinho, que por muitas vezes mesmo ausente, me compreenderam e me deram forças.

Aos meus avós Galdino Gomes Leal (*in memoriam*) e Antonia Leal, a minha tia Renata Leal por sempre me apoiarem e se fazerem presentes em minha vida. Amo vocês.

Ao meu namorado Danilo Dressano por toda atenção, paciência, dedicação, compreensão, amizade, companheirismo, força e apoio que me foi concedido. Obrigada por fazer parte da minha vida. Amo muito você.

## Resumo

*Streptococcus mutans* é o principal patógeno da cárie dental em humanos, por ser capaz de se acumular no biofilme dentário principalmente na presença de sacarose e produzir e tolerar grandes concentrações de ácidos, os quais causam a desmineralização dos dentes. Além disto, *S. mutans* pode estar associado à etiologia da endocardite bacteriana, doença cuja evolução envolve a formação de biofilmes em válvulas cardíacas lesadas. *S. mutans* expressa diversas proteínas de superfície envolvidas na adesão e acúmulo bacteriano em biofilmes. Estas incluem as glucosiltransferases (codificadas por *gtfB*, *gtfC* e *gtfD*), as quais sintetizam glucanos extracelulares a partir da sacarose, e as proteínas ligantes de glucano (codificadas por *gbpA*, *gbpB*, *gbpC* e *gbpD*). Os genes *gtfB/C/D*, *gbpB/C* são controlados diretamente pela proteína reguladora CovR. Em diversas espécies patogênicas de *Streptococcus*, como *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*, CovR compõe o sistema regulador de transcrição de dois componentes CovRS (Cov, de control of virulence), o qual regula diversos genes de virulência. Em *S. mutans*, CovR foi identificado como um regulador órfão pois o gene que codifica o receptor de membrana cognato não foi identificado no mesmo *locus* gênico de *covR*. Em *S. mutans*, CovR regula diversos genes envolvidos na formação de biofilmes (*gtfB/C*, *gbpC* e *gbpB*), na biossíntese do envelope celular e na resposta a estresses. Os estímulos que ativam CovR em *S. mutans* ainda não são conhecidos. O presente projeto visa caracterizar a participação de CovR na resposta de *S. mutans* ao contato com a saliva e sangue humano. Para isto, uma cepa knock-out de *covR* foi comparada com a respectiva cepa selvagem quanto ao crescimento e/ou sobrevivência em saliva e sangue de voluntários saudáveis. O efeito da exposição à saliva na expressão dos genes regulados diretamente por CovR também foi avaliado.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, *covR*, Viabilidade em saliva, Viabilidade em sangue, regulon CovR.

## Abstract

*Streptococcus mutans* is the main pathogen of dental caries in humans, because it can accumulate in the biofilm in the presence of sucrose and produce and tolerate high concentrations of acids, which cause demineralization of teeth. Moreover, *S. mutans* is involved in the etiology of bacterial endocarditis, a disease whose evolution involves the formation of biofilms on damaged heart valves. *S. mutans* expresses several surface proteins involved in bacterial adhesion and accumulation in biofilms. These include the glucosyltransferases (*gtfB*, *gtfC* and *gtfD*), which synthesize extracellular glucans from sucrose, and glucan binding proteins (encoded by *gbpA/B/C/D*). The genes *gtfB/C/D*, and *gbpB/C* are directly controlled by the regulatory protein CovR. In several pathogenic species of *Streptococcus*, such as *S. pyogenes* and *S. agalactiae*, CovR is the transcriptional regulator that compose the two-component system CovRS (Cov for control of virulence), which regulates several virulence genes. In *S. mutans*, CovR was identified as an orphan regulator, because the gene encoding its cognate membrane receptor was not identified at the same *locus* of *covR*. In *S. mutans*, CovR regulates several genes involved in biofilm formation (*gtfB/C*, and *gbpB/C*), in biosynthesis of the cell envelope and in stress responses. The stimuli which activate CovR in *S. mutans* are not yet known. This project aims to characterize the participation of CovR in *S. mutans* response to contact with saliva and blood. To this purpose, a knock-out mutant of *covR* was compared with parent strain regarding growth and/or survival in human saliva and blood. The effect of exposure to saliva in the expression of genes directly by *covR* was also analyzed.

Key words: *Streptococcus mutans*, *covR*, contact with saliva, contact with blood, CovR regulon.

## Lista de Abreviaturas adotadas e unidades de medida

°C: grau Celsius

10% CO<sub>2</sub>: pressão parcial de dióxido de carbono a 10%

*16SrDNA*: gene codificador do RNA ribossômico 16S

16SrRNA: RNA ribossômico 16S

23SrRNA: RNA ribossômico 23S

ABS: absorvância

A<sub>nm</sub>: absorvância no comprimento de onda especificado

BHA: *Brain Heart Infusion* com agar a 1,5% (peso/volume)

BHI: infusão de cérebro e coração comercial (de *Brain Heart Infusion*)

cDNAs: DNA complementar

CovSR: sistema de dois componentes (S: sensor, R: regulador) de controle de virulência (*control of virulence*).

DEPC: *diethylpyrocarbonate*

DNA: ácido desoxirribonucléico genômico (de *desoxy-ribonucleic-acid*)

dNTP: trifosfatos de desoxirribonucleotídeos

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

*et al.*: e outros (de *et alli*)

erm.: eritromicina

Fase log: fase logarítmica de crescimento

g: gramas

GAS: grupo A de *Streptococcus*

GBS: grupo B de *Streptococcus*

*gbpB*: gene codificador da proteína ligante de glucano B

GbpA: proteína ligadora de glucano A

GbpB: proteína ligadora de glucano B

GbpC: proteína ligadora de glucano C

GbpD: proteína ligadora de glucano D

Gbps: proteínas ligadora de glucano (de *Glucan-binding proteins*, deste trabalho)

GcrR: CovR

GtfB: proteína glucosiltransferase B

*gtfB*: gene codificador da proteína glucosiltransferase B

*gtfC*: gene codificador da proteína glucosiltransferase C

GtfC: proteína glucosiltransferase C

*gtfs*: genes glucosiltransferases (deste trabalho)

Gtfs: proteínas glucosiltransferases (deste trabalho)

h: horas

HK: histidina-quinase

IgA: imunoglobolína A

L: litro

mL: mililitro

mM: milimolar

M: molar

min: minuto

Mg: magnésio

MOPS: morpholinopropane sulphonic acid

MQD: meio quimicamente definido

ng: nanogramas

ORF: fases abertas de leitura (de *Open Reading frame*)

pb: pares de base

PCR: reação em cadeia da polimerase (de *Polymerase Chain Reaction*)

pH: potencial hidrogênico

PMN: polimorfonucleares

RNA: ácido ribonucléico (de *Ribonucleic Acid*)

RNAm: ácido ribonucléico mensageiro

RNAse: ribonuclease

RR: regulador de resposta

RT: transcrição reversa

RT-PCR quantitativa: PCR em tempo real quantitativa

*S. mutans*: *Streptococcus mutans*

s: segundo

SDC: sistemas de dois componentes (de *Two Component System*)

TE: tampão Tris-EDTA

THB: *Todd-Hewitt* caldo (de *Todd-Hewitt broth*)

U: unidade(s)

UA159: *Streptococcus mutans* UA159

UAcov: *Streptococcus mutans* UA159 *covR*

UE: unidades de expressão gênica

ufc: unidade formadora de colônia

µm: micrometro

UR: unidades relativas de expressão gênica

VicKR: sistema de dois componentes (K: sensor, R: regulador ) de regulador de virulência (*virulence control*)

xg: unidade de força centrífuga relativa (RCF)

## Lista de figuras

	Página	
Fig. 1	Curva de crescimento em Meio Quimicamente Definido de <i>S. mutans</i> UA159 (-▲-) e mutante UAcov (-■-). Os pontos indicam média de três experimentos independentes. As barras indicam desvio padrão.	23
Fig. 2	Curvas de crescimento das cepas UA159 (-▲-) e UAcov (-■-) em MQD com concentrações crescentes de Mg. Os pontos indicam médias de três experimentos independentes. As barras indicam os desvios padrões.	24
Fig. 3	Curvas de viabilidade das cepas UA159 (-■-) e UAcov (-▲-) em saliva. Curvas foram obtidas de <i>pools</i> de saliva de seis voluntários (A a F). Os pontos representam médias de 3 experimentos independentes, as barras indicam os desvios padrão.	26
Fig. 4	Curvas de viabilidade das cepas UA159 (-■-), UAcov (-▲-) e UAcov complementado com gene <i>covR</i> (UAcov:: <i>covR</i> ) (-●-) em saliva do voluntário F. Os pontos representam médias de três experimentos independentes, as barras indicam os desvios padrão. A cepa UA159 e UAcov:: <i>covR</i> tiveram comportamento semelhante.	27
Fig. 5	Curvas de viabilidade das cepas UA159 (-■-) e UAcov (-▲-) em sangue. Curvas foram obtidas de sangue de seis voluntários saudáveis (A a F). Os pontos representam médias de 3 experimentos independentes, as barras indicam os desvios padrão	28
Fig. 6	Padrão típico do RNA extraído das cepas UA159 (1, 2, 3) e UAcov (4, 5, 6) expostas à saliva nos tempos de 0, 30, 60 minutos respectivamente, separado em gel desnaturante de agarose a 1,2%. A presença de duas bandas bem definidas referentes aos RNAs expressos em maior quantidade indicando a integridade das amostras.	29
Fig. 7	Análise de RT-PCR quantitativo das mudanças na expressão dos genes reguladores <i>covR</i> , <i>vicR</i> , <i>ccpA</i> em resposta ao contato com saliva durante 30 (barras escuras) e 60 (barras brancas) minutos. Três experimentos independentes foram realizados para as cepas UA159 (A) e UAcov (B). As colunas representam as médias de três experimentos independentes das mudanças na quantidade de transcritos nas bactérias expostas à saliva em relação a bactérias das mesmas culturas antes do tratamento com saliva. As barras indicam os desvios padrão.	31

Fig. 8 Análises de RT-PCR quantitativo das mudanças na expressão dos genes do regulon de CovR *gbpC* e *gtfB* em resposta ao contato com saliva durante 30 (barras escuras) e 60 (barras brancas) minutos, para a cepa UA159 (A) e UAcov (B), em três experimentos independentes. As colunas representam as mudanças na quantidade de transcritos nas bactérias expostas à saliva em relação a bactérias das mesmas culturas antes do tratamento com saliva. As barras indicam os desvios padrão dos ensaios em triplicata.

32

## Lista de tabela

	Página
Tab. 1 Genes identificados como parte do regulon de CovR em <i>S. mutans</i> .	20
Tab. 2 Oligonucleotídeos utilizados neste estudo.	21
Tab. 3 Valores de expressão gênica expressos em número de vezes em relação aos controles (cepas não expostas à saliva) após diferentes tempos de exposição à saliva para as cepas UA159 e UAcov.	32

## **Sumário**

1	Introdução	01
2	Revisão de Literatura	03
3	Proposição	13
4	Material e métodos	14
5	Resultados	23
6	Discussão	33
7	Conclusão	42
8	Referências	43
	Anexos	52

# 1. Introdução

*Streptococcus mutans* é uma espécie bacteriana comum da microbiota oral de humanos envolvida na patogênese da cárie e em endocardites infecciosas promovidas por bacteremias de origem bucal. O maior nicho ecológico de *S. mutans* em humanos é a superfície dental, embora a cavidade oral possa funcionar como um reservatório para a colonização bacteriana dos dentes (Alves *et al.*, 2009; Stinson *et al.*, 2003; Marcotte & Lavoie, 1998). A transmissão de *S. mutans* ocorre nos primeiros anos de vida, através do contato com indivíduos colonizados (Berkowitz, 2006; Caufield *et al.*, 1993), um processo que provavelmente é influenciado por fatores microbianos, do hospedeiro e ambientais, que modulam a competitividade bacteriana e as defesas imunológicas do hospedeiro (Smith & Mattos-Graner, 2008). Para serem transmitidos e ocupar seus nichos ecológicos, *S. mutans* precisam persistir na saliva e se adaptar fisiologicamente a cada fase da colonização e patogênese oral, esses eventos envolvem muitas alterações no transcriptoma bacteriano.

A adaptação de transcriptomas bacterianos em resposta aos estímulos do ambiente é controlada por sistemas de dois componentes (SDC) (Lamy *et al.*, 2004; Dalton *et al.*, 2006). Um SDC típico é composto por um receptor de membrana, normalmente uma histidina-quinase (HK), e uma proteína reguladora intracelular denominada regulador de resposta (RR). A porção externa do receptor de membrana é ativada por um estímulo ambiental específico, sofrendo fosforilação na sua porção intracelular (Dalton *et al.*, 2006). O grupo fosfato é então transferido para um regulador de resposta intracelular, o qual sofre modificação da sua conformação para se ligar às sequências reguladoras dos genes alvo, o que pode reprimir ou induzir a transcrição dos mesmos. Os genes que codificam os componentes destes sistemas são frequentemente organizados em operons, mas várias HK ou RR são designados “órfãos” quando codificados por genes isolados, sem seu respectivo par. O genoma da cepa de *S. mutans* UA159 contém pelo menos 13 SDC completos. Além disso, um RR órfão, designado GcrR, foi identificado. GcrR também é conhecido como CovR, devido à sua alta similaridade com o RR do SDC CovSR (Cov, de contrôle da virulência), um dos mais estudados

SDC das espécies patogênicas *Streptococcus pyogenes* (GAS) e *Streptococcus agalactiae* (GBS) (Chong *et al.*, 2008). Em GAS e GBS, CovR pode atuar como um regulador negativo (repressor) e positivo (indutor) de diferentes genes (Churchward, 2007; Lamy *et al.*, 2004). Transcriptomas de mutantes *covR* diferem significativamente, dependendo do estágio da infecção em modelos *in vivo* e nichos ambientais (Shelburne *et al.*, 2010).

Há evidências de que CovSR modula a adaptação GBS e GAS ao contato com sangue e saliva humano, através da regulação de genes de virulência, de evasão às defesas do hospedeiro e genes metabólicos (Graham *et al.*, 2005; Mereghetti *et al.*, 2008). Em *S. mutans*, CovR reprime diretamente genes importantes para a síntese e interação com glucano, um componente importante da matriz do biofilme. Estes incluem *gtfB/C*, *gbpB/C*; que codificam respectivamente glucosiltransferase B e C, proteína ligadora de glucano B (GbpB) e proteína ligadora de glucano C (GbpC). Consistentemente, a inativação de *covR* em *S. mutans* aumenta significativamente a formação de biofilmes na presença de sacarose (Stipp *et al.*, 2010). Assim CovR parece regular funções de *S. mutans* para estabelecimento em biofilmes. Neste estudo, nós investigamos a hipótese de que CovR pode estar envolvido nos eventos iniciais da colonização bucal e/ou de sobrevivência em sangue durante bacteremias, através da determinação do papel deste RR na sobrevivência e crescimento de *S. mutans* em saliva e sangue humanos.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 *S. mutans* em infecções bucais e sistêmicas

*S. mutans* é a principal espécie bacteriana envolvida na etiologia da cárie, pois apresenta um conjunto de fatores de virulência que a torna capaz de se aderir às superfícies dos dentes e se acumular no biofilme dental, através da produção de uma matriz extracelular polissacarídica. *S. mutans* é capaz de produzir ácidos e tolerar condições ambientais extremas, como pH inferior a 4,0, aumentando em proporção na complexa comunidade microbiana dos biofilmes e induzindo a desmineralização dos dentes (van Houte & Russo, 1986; Lemos *et al.*, 2005). Assim, a capacidade de *S. mutans* em responder rapidamente aos diversos estresses decorrentes da infecção, como o estresse acidogênico, oscilações na disponibilidade de nutrientes, variações na temperatura, tensão de oxigênio e contato com fatores de defesa do hospedeiro é importante para a virulência (Lemos *et al.*, 2005).

Além de um papel central na etiologia da cárie, estima-se que *S. mutans* e outras espécies de estreptococos orais sejam responsáveis por 45 a 80% dos casos das endocardites bacterianas (Stinson *et al.*, 2003). A bacteremia por estreptococos orais pode ser provocada por procedimentos como a simples escovação dentária (Lockhart *et al.*, 2008). *S. mutans* são detectados em amostras de sangue e de tecido cardiovascular, tais como das válvulas cardíacas e placas eritematosas, em indivíduos acometidos por endocardite bacteriana (Lockhart *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 2007). Essa bactéria é ainda capaz de invadir e promover a morte de células endoteliais *in vitro*, o que pode contribuir para o envolvimento destes microrganismos na patogenia da endocardite e aterosclerose (Stinson *et al.*, 2003). Ao implantarem-se em válvulas cardíacas, estreptococos compõem um biofilme (ou vegetação) sendo envolvidos por uma matriz de fibrina e plaquetas (Parsek & Singh, 2003). Biofilmes microbianos desenvolvidos em tecidos internos, como as válvulas cardíacas, são altamente resistentes à terapia com antibióticos, dificultando o tratamento destas infecções (Parsek & Singh, 2003). A severidade da infecção bucal, fatores de defesa do hospedeiro e fatores

bacterianos podem influenciar no risco de ocorrência destas infecções sistêmicas. Entre os fatores bacterianos, é possível que proteínas envolvidas na capacidade de formação de biofilmes sejam importantes (Costerton *et al.*, 1999; Parsek & Singh, 2003; Stinson *et al.*, 2003). Os biofilmes consistem em uma comunidade bacteriana altamente organizada em uma matriz extracelular composta, em grande parte, por polissacarídeos extracelulares os quais, além de uma função estrutural, modulam a adaptação a variações na disponibilidade a nutrientes e a resposta a condições de estresse (Lemos *et al.*, 2005; Parsek & Singh, 2003). A matriz extracelular dificulta também o reconhecimento e destruição bacteriana por fatores do sistema imunológico, gerando processos inflamatórios crônicos (Costerton *et al.*, 1999; Parsek & Singh, 2003).

Entre as diversas proteínas envolvidas na capacidade de formação de biofilmes, as glucosiltransferases (Gtf) são as mais estudadas. A partir da sacarose as Gtfs de *S. mutans* (GtfB, GtfC e GtfD) sintetizam glucanos com diferentes graus de solubilidade. Estas enzimas desempenham papel muito importante na etiologia da cárie, como verificado em diversas análises *in vitro* e *in vivo* de mutantes *knock-out* dos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* (Banas *et al.*, 2003; Tsumori & Kuramitsu, 1997). A função destas proteínas na patogenia de infecções sistêmicas é incerto, mas há evidências de que glucanos adsorvidos à superfície bacteriana funcionam como adesinas que se ligam às válvulas cardíacas (Parsek & Singh, 2003). Além das Gtfs, *S. mutans* expressam pelo menos quatro proteínas ligadoras de glucanos (Gbps, de Glucan-binding proteins), GbpA, GbpB, GbpC e GbpD. As Gbps formam um grupo heterogêneo quanto as suas características moleculares e funcionais, e seus papéis específicos na patogenia da cárie são pouco compreendidos. Dentre as Gbps estas, a GbpB, tem sido alvo de nossos estudos nos últimos anos. A GbpB é uma proteína secretada ou associada à superfície de *S. mutans*, a qual é imunodominante em adultos e crianças (Smith & Mattos-Graner, 2008; Nogueira *et al.*, 2005). Esta proteína apresenta extensa homologia a hidrolases de mureína (Mattos-Graner *et al.*, 2001) e é essencial para a viabilidade de *S. mutans*, possivelmente por participar do processo de divisão da parede celular (Duque *et al.*, 2011). A produção de GbpB é positivamente associada à

capacidade de formação de biofilmes *in vitro* (Mattos-Graner *et al.*, 2001), ao passo que a inibição da expressão de GbpB diminui drasticamente a capacidade de *S. mutans* em iniciar biofilmes, além de alterar a morfologia e diversas características bacterianas, as quais incluem o aumento da hidrofobicidade de superfície, redução da atividade autolítica e aumento da sensibilidade a diversos antibióticos e ao estresse oxidativo (Duque *et al.*, 2011). A indução de anticorpos contra GbpB protege contra a infecção e desenvolvimento de cárie em modelos animais (Smith & Mattos-Graner, 2008). Outra proteína ligadora de glucano que difere estruturalmente de GbpB, a GbpC, a qual é covalentemente ligada à parede celular e está envolvida na agregação dependente de dextrano e na resposta ao estresse osmótico e acidogênico (Sato *et al.*, 2000; Biswas *et al.*, 2007). A expressão de *gbpC* foi positivamente associada à virulência em modelos de cárie experimental e à capacidade de causar bacteremia (Nomura *et al.*, 2004; Matsumoto-Nakano *et al.*, 2007).

Em *S. mutans*, os genes que codificam GtfB/C/D, GbpB e GbpC são diretamente regulados pelos sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (SDC) VicKR e CovR (Senadheera *et al.*, 2005; Senadheera *et al.*, 2007; Biswas *et al.*, 2007; Stipp *et al.*, 2010). Estes sistemas são conservados entre diversas espécies de estreptococos patogênicos que colonizam as mucosas, como *S. agalactiae* (GBS) e *S. pyogenes* (GAS), e regulam diversos genes de virulência expressos durante os processos de infecção (Dalton *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2002; Lamy *et al.*, 2004). Diferente de *S. mutans*, em cujo genoma o gene *covR* está isolado, em GAS e GBS, CovR é parte do SDC CovRS, sendo os genes *covR* e *covS* organizados em operons (Dalton *et al.*, 2006).

## **2.2 Sistema de dois componentes (SDC) e CovR.**

Os sistemas de dois componentes (SDCs) são fundamentais para a detecção, resposta e adaptação bacteriana a estímulos ambientais (Lamy *et al.*, 2004; Dalton *et al.*, 2006). Os SDCs são compostos por um receptor de membrana, normalmente uma histidina-quinase (HK) e uma proteína

reguladora intracelular denominada regulador de resposta (RR). A porção externa do receptor de membrana é ativada por um estímulo ambiental específico sofrendo fosforilação na sua porção intracelular (Dalton *et al.*, 2006). O grupo fosfato é então transferido para um regulador de resposta intracelular, o qual sofre modificação da sua conformação para se ligar às sequências reguladoras dos genes, o que pode reprimir ou induzir a transcrição dos mesmos. Os genes que codificam os componentes dos SDC estão comumente organizados em operons. Entretanto, os genomas de diversas bactérias também incluem genes que codificam proteínas dos SDC (receptor de membrana ou reguladores de respostas) em *locus* separados do seu receptor ou regulador cognato. Estas proteínas reguladoras são comumente designadas componentes órfãos de SDC. O genoma da cepa *S. mutans* UA159 contém treze SDC (Ajdic *et al.*, 2002; Chong *et al.*, 2008). Além deste, *S. mutans* expressa um regulador de resposta órfão, CovR, cujo receptor de membrana cognato (CovS) não foi identificado em nenhuma cepa desta espécie (Chong *et al.*, 2008).

Em *S. mutans*, dois SDC parecem regular de forma antagônica diversos fatores de virulência, dentre eles, fatores associados à formação de biofilmes. Estes incluem os sistemas VicKR e CovR. O SDC VicKR induz a expressão dos genes *gtfB/C/D* e *gbpB* (Senadheera *et al.*, 2005; Senadheera *et al.*, 2007), enquanto CovR reprime estes mesmos genes de virulência (Biswas *et al.*, 2007; Stipp *et al.*, 2009). O regulador CovR, também conhecido como CsrR (CsrR de Capsule Synthesis Regulator), é um dos genes reguladores mais estudados em *Streptococcus pyogenes* (GAS, estreptococos do grupo A) (Dalton *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2002) e *Streptococcus agalactiae* (GBS, estreptococos do grupo B) (Lamy *et al.*, 2004). GAS estão envolvidos em diversas doenças que variam desde infecções superficiais da pele e mucosas, até infecções severas como fasciite necrosante e síndrome do choque tóxico (Dalton *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2002). GBS representam um dos principais agentes de sepse neonatal e meningite (Lamy *et al.*, 2004). Em GAS, análises do transcriptoma de mutantes dos genes *covRS* indicam que este sistema regule cerca de 15% dos genes que compõem seu genoma

(Graham *et al.*, 2002). Nesta espécie, CovR é um regulador negativo de diversos genes de virulência, entre estes diversos fatores anti-fagocíticos e de evasão à resposta imunológica, como a biossíntese de cápsula e fatores que interferem na ativação de diversas cadeias da resposta imunológica (cascata do complemento, via das quininas, coagulação e fibrinólise) (Graham *et al.*, 2002). A inativação de *covR* promove ainda resistência à fagocitose mediada pelo complemento (Levin & Wessels, 1998) e aumento da virulência em modelos animais (Graham *et al.*, 2002). A inativação dos ortólogos de *covRS* em GBS promove alterações no fenótipo de virulência contrárias às observadas em GAS, a despeito da semelhança genômica entre estas espécies (Lamy *et al.*, 2004). Em GBS, a inativação de *covRS* promove significativa redução na virulência em modelos de septicemia em ratos neonatos (Lamy *et al.*, 2004). Análises do transcriptoma das cepas de GBS *covRS* alteraram a expressão de 7% dos genes em relação à cepa selvagem. Entretanto, diferentemente do observado em GAS, onde CovR atua principalmente como repressor, cerca de apenas 54,7% dos genes do regulon de CovRS em GBS são reprimidos, outros 45,3% são ativados (Lamy *et al.*, 2004). Estudos têm sido realizados por nosso grupo para caracterizar o regulon de CovR em cepas *S. mutans* (Stipp *et al.*, 2010). Em todas as cepas analisadas, a inativação de *covR* promoveu aumento na expressão de GtfB/C/D, como descrito nas cepas GS5 e UA159 (Idone *et al.*, 2003; Biswas & Biswas, 2006), e de GbpB (Stipp *et al.*, 2009). Comparações entre os transcriptomas da cepa mutante UA159 *covR* (designada UAcov) e cepa selvagem revelaram ainda que além de *gbpB*, diversos genes envolvidos na biossíntese de parede celular foram afetados, muitos destes são regulados diretamente por CovR, como verificado em ensaios de ligação DNA-CovR (Stipp *et al.*, 2009). Estes incluem os genes SMU.2147 (*lysM*), SMU.1091 (*wapE*) e SMU.1437 (*udp*), os quais codificam respectivamente uma proteína hipotética com um domínio LysM, a proteína de parede celular WapE e uma UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerase (YvyH). O domínio LysM é envolvido na ligação a peptidoglicano e lise de parede celular, sendo comum em autolisinas (Layec, 2008). As UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerases catalisam a

interconversão de UDP-N-acetilglucosamina e UDP-N-acetilmanosamina (UDP-ManNAc) (Yokoyama *et al.*, 1989). UDP-ManNAc é requerida para a ligação de ácidos teicóicos na parede celular e para a biossíntese de polissacarídeos de superfície celular (Campbell *et al.*, 2000). SMU.2146 (*murL*) possível gene que codifica transglicosilase, a qual está envolvida na degradação de mureína. O gene SMU.1591 (*ccpA*) codifica uma proteína A de controle catabólico, o SMU.1396 (*gbpC*) codifica uma proteína ligadora de glucano C (GbpC) e SMU.22 (*gbpB*) codifica a proteína ligadora de glucano B (GbpB). O gene SMU.1117 (*nadh*) codifica uma NADH. NADH oxidase é uma enzima que doa H para a NAD, a qual encontra-se ligada a proteínas ligadas a face interna da membrana citoplasmática, essas recebem átomos de hidrogênio que a partir de várias reações são transferidos a outras proteínas podendo gerar crescimento para alguns organismos. (Altschul *et al.*, 1997; Madigam *et al.*, 2004). A inativação de *covR* gerou ainda aumentos significativos na formação de biofilmes *in vitro*, promoveu redução da velocidade e intensidade de crescimento planctônico e reduziu a frequência de transformação (Stipp *et al.*, 2009).

Pouco se sabe sobre os fatores ambientais capazes de ativar CovR. Em *S. pyogenes*, apenas dois estímulos percebidos por CovSR foram identificados, altas concentrações de cátion  $Mg^{2+}$  (~15 mM) e a presença do peptídeo catiônico LL-37 (Gryllos *et al.*, 2008; Murakami *et al.*, 2002). Em *S. pyogenes*, concentrações crescentes de  $Mg^{2+}$  ativam CovR, reprimindo genes de virulência (Murakami *et al.*, 2002), enquanto que a presença de LL-37 parece inibir este sistema e induzir a expressão de genes de seu regulon (Gryllos *et al.*, 2008). Em *S. mutans*, a expressão de *covR* parece também ser induzida por concentrações crescentes de  $Mg^{2+}$  (Chong *et al.*, 2008). Ambos os estímulos (concentrações de  $Mg^{2+}$  e presença LL-37) envolvem modificações ambientais provocadas pela interação entre os patógenos e componentes do hospedeiro. Através da regulação dependente de  $Mg^{2+}$ , genes de virulência reprimidos por CovR seriam mais expressos por GAS em contato com o sangue ou outros fluidos teciduais, os quais apresentam baixas concentrações deste cátion (~1mM) (Gryllos *et al.*, 2007; Gryllos *et al.*, 2008).

O peptídeo LL-37 é um componente do sistema imune inato produzido por neutrófilos e também por células das glândulas salivares e mucosa bucal (Murakami *et al.*, 2002). Apesar de seus efeitos antimicrobianos, LL-37 parece inibir a ativação do sistema CovRS, uma vez que GAS apresentam aumento da expressão de diversos genes de virulência CovR-regulados e maior resistência à fagocitose em resposta a LL-37 (Gryllos *et al.*, 2008). Estes dados sugerem que diferentes estímulos do hospedeiro modulam de forma conjunta a ativação/inibição do sistema CovRS. LL-37 é detectado na saliva em concentrações variáveis entre indivíduos, sendo originados de neutrófilos bucais, fluido gengival, glândulas e ductos salivares, mas não foi identificada uma associação entre concentrações salivares deste peptídeo com a colonização por *S. mutans* e/ou susceptibilidade à cárie (Dale *et al.*, 2006). Os dados de que o regulon de CovR em *S. mutans* inclui diversas proteínas de superfície envolvidas na biogênese de parede celular e na respostas ao estresse ao envelope celular, sugerem que este regulador desempenhe função importante na resposta de *S. mutans* a fatores de defesa do hospedeiro. Diversas proteínas de superfície de *S. mutans* parecem influenciar na susceptibilidade à fagocitose e na capacidade de causar bacteremia e endocardite bacteriana, incluindo as proteínas GbpC, proteína de antígeno de superfície celular (PAc), Antígeno I/II e D (Nakano *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2006; Nomura *et al.*, 2004).

### **2.3 Resposta de estreptococos a componentes salivares e séricos.**

A cavidade bucal apresenta uma microbiota altamente complexa e é um dos sítios com maior número e diversidade de microrganismos do corpo humano (Jenkinson & Lamont., 2005; Kuramitsu *et al.*, 2007). Esta microbiota é continuamente controlada por fatores do sistema imunológico inato e adaptativo presentes na saliva e no fluido crevicular, exsudato do soro que atinge os sulcos gengivais. Estes fluidos bucais são também importantes para o controle de infecções por outros patógenos das mucosas oral e respiratória como GAS e *S. pneumoniae* (Shelburne *et al.*, 2005 a). A saliva contém um grande número de

componentes do sistema imune inato, muitos produzidos por neutrófilos e outras células das glândulas salivares e mucosas, incluindo-se diversos peptídeos com ação antimicrobiana, como por exemplo, a catalecidina LL-37, histatinas,  $\alpha$  e  $\beta$ -defensinas. (Murakami *et al.*, 2002; Tenovuo *et al.*, 2002; Abiko *et al.*, 2003). Além disto, a saliva contém anticorpos secretados, principalmente IgAs, os quais modulam a colonização bucal por espécies patogênicas de estreptococos (Nogueira *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2008). O fluido crevicular contém outros componentes de defesa inatos (por exemplo, fatores do complemento) e adaptativos (anticorpos séricos) presentes no soro, além do grande número de fagócitos (cerca de 90% destes são neutrófilos) (Amerongen & Veerman, 2002; Ashkenazi *et al.*, 1989).

Espécies patogênicas de *Streptococcus* desenvolveram vários mecanismos de reconhecimento e resposta a fatores do sistema imune, presentes nos diversos fluidos que banham as mucosas e no sangue (Shelburne *et al.*, 2005 a; Hamilton *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2005). Por exemplo, GAS expressam diversos fatores anti-fagocíticos e de escape a diversos componentes de defesa solúveis. Muitos destes fatores são regulados por CovRS, como por exemplo o operon *has*, envolvido na biossíntese de cápsula de ácido hialurônico (Graham *et al.*, 2005). Estudos *in vivo* demonstram que há indução da expressão do operon *has* em cepas de GAS presentes na corrente sanguínea de animais infectados (Gryllos *et al.*, 2001). Diversos outros genes de evasão a fatores de defesa do hospedeiro são ativados em GAS em resposta ao contato com o sangue humano, como verificado em experimentos *ex vivo* (Graham *et al.*, 2005). Comparações entre os transcriptomas da cepa GAS M1 com o respectivo genótipo mutante *covR* crescidos em sangue humano fresco sugere que o sistema CovRS module a adaptação de GAS aos estresses desencadeados pelo contato com o sangue humano (Graham *et al.*, 2005). Diferentemente de GAS e GBS, *S. mutans* não estão envolvidos em infecções invasivas, o que explica a ausência no seu genoma de vários genes envolvidos no escape à fagocitose e ao sistema complemento. Entretanto, *S. mutans* conserva ortólogos de genes de GAS e GBS que codificam proteínas com função ainda desconhecida, mas com possível papel de evasão do sistema imune, os quais incluem uma proteína de ligação a fibronectina, similar a

PavA de *S. pneumoniae*, que tem a função de proteger contra a opsonização pelos fagócitos, SloC está contido em um operon que codifica um sistema transpostador ABC (*ATP-binding cassette*) que é similar ao sistema *psa*, importante na virulência de *S. pneumoniae*. (Mitchell, 2003). O genoma da cepa *S. mutans* contém ainda o SDC ortólogo ao sistema ScnRK de GAS, o qual regula fatores de escape à destruição por fagócitos. A inativação deste sistema em *S. mutans* promove aumento significativo da destruição bacteriana por macrófagos e aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo (Chen *et al.*, 2008). Em GAS, ScnRK regula diversos genes envolvidos na biogênese da parede celular e a inativação deste sistema promove aumento da sensibilidade a defensinas (Poyart *et al.*, 2003).

Pouco se sabe sobre a resposta de espécies patogênicas de *Streptococcus* presentes na mucosa orofaríngea, como GAS, *S. pneumoniae* e *S. mutans*, ao contato com a saliva. Em GAS, foi demonstrado que vários genes de virulência são induzidos em cepas crescidas *ex vivo* em saliva (Shelburne *et al.*, 2005 a); muitos dos genes identificados são regulados por CovRS, incluindo-se genes envolvidos em funções de escape a fatores do sistema imunológico (Shelburne *et al.*, 2005 b). Em *S. mutans*, não há até o momento, estudos avaliando a expressão de genes de virulência em resposta à saliva, apesar do papel central desta espécie em uma das doenças mais comuns da cavidade bucal. A maioria dos estudos sobre os mecanismos de virulência de *S. mutans* envolvem estudos *in vitro* de cepas crescidas em fase planctônica ou biofilmes em meios de cultura artificiais, o que exclui a influência de diversos fatores salivares aos quais *S. mutans* enfrenta durante a colonização bucal. É provável que sistemas reguladores globais envolvidos na regulação de genes de virulência de *S. mutans* desempenhem papel importante na resposta bacteriana a fatores de defesa presentes na cavidade bucal e no sangue, influenciando tanto na capacidade de colonização e persistência destes microrganismos nas mucosas e no biofilme dentário, como na capacidade de causar bacteremia e endocardite bacteriana. Uma primeira etapa para investigar esta hipótese seria a de caracterizar a influência de CovR no crescimento e sobrevivência de *S. mutans* na presença de saliva e de sangue e avaliar se o contato com estes fluidos influencia na expressão de genes diretamente regulados por CovR identificados em estudos *in vitro*.

## 2.4 Transmissão de *S. mutans*

Logo ao nascimento, as crianças adquirem uma série de microrganismos que compõem a microbiota bucal, os quais são transmitidos através da saliva por indivíduos com os quais a criança tem contato, sendo essa a principal via de *transmissão de S. mutans* (Kohler & Bratthall, 1979). A colonização por *S. mutans* ocorre principalmente dentro de um período definido como “janela de infectividade” compreendido entre os 19 a 31 meses de idade (Caufield *et al.*, 1993). Dependendo da presença e intensidade de fatores que favorecem essa transmissão e estabelecimento na cavidade oral, a colonização pode ocorrer logo antes do primeiro ano de vida (Alves *et al.*, 2009; Freire *et al.*, 1996). Esses fatores podem ser ambientais e/ou do hospedeiro. Os fatores do hospedeiro incluem os componentes de defesa inatos e adaptativos presentes na cavidade bucal (saliva, fluido gengival e tecidos linfóides associados às mucosas), sendo o ambiente na cavidade oral um local crítico de interface entre o ambiente externo e o interno (Sato *et al.*, 2008). O contínuo fluxo da saliva remove um grande número de bactérias da superfície dos dentes e da mucosa, além de conter diversos fatores de defesa específicos (anticorpo IgA) e inespecíficos (fatores de defesa que incluem as mucinas, glicoproteínas salivares, lactoferrina, lisozima, peroxidases, histatina e cistatinas) (Sato *et al.*, 2008). Os fatores ambientais incluem a frequência de consumo de sacarose, açúcar que favorece a colonização bucal por *S. mutans* e a frequência de contato salivar com indivíduos colonizados por *S. mutans* (Berkowitz & Jordan, 1975; Caufield *et al.*, 1993; Kozai *et al.*, 1999; Alves *et al.*, 2009). Portanto, para colonizar e se estabelecer na cavidade bucal, *S. mutans* precisa manter-se viável em saliva humana, adaptando-se às condições deste fluido.

### 3 . Proposição.

O objetivo geral deste estudo foi investigar a participação de CovR na resposta de *S. mutans* ao contato com a saliva e sangue humanos. Para isto, os objetivos específicos deste trabalho incluíram:

1. Comparar a viabilidade e/ou crescimento em saliva e em sangue humano entre cepa *S. mutans* mutante *covR* (UAcov) e a sua respectiva cepa selvagem (UA159).

2. Comparar a expressão de genes de virulência regulados diretamente por CovR: *gpbB* (SMU.22), *gpbC* (SMU.1396), *covR* (SMU.1924), *lysM* (SMU.2147c), *wapE* (SMU.1091); *udp* (SMU.1437c), *nadh* (SMU.1117), *murL* (SMU.2146c), *gtfB* (SMU.1004), e dos genes reguladores *ccpA* (SMU.1591), *vicR* (SMU.1517), entre UAcov e UA159, após exposição à saliva.

## 4. Material e Métodos.

### 4.1 Cepas e condições de cultivo.

Foram estudadas as cepas *S. mutans* UA159, cepa mutante *covR*, designada UAcov, construída a partir de UA159, através de projeto de pesquisa financiado pela FAPESP; proc. 2007/57454-2) (Alves *et al.*, 2009). Como controle, também testamos a cepa mutante UAcov complementada com cópia intacta do gene *covR* em plasmídeo pDL2711, o qual contém o gene de resistência à espectinomicina. Para cada ensaio, as cepas foram cultivadas a partir dos estoques congelados a - 20 °C, em meio Skim Milk (DIFCO Labs, EUA). As cepas foram estriadas em Mitis Salivaris Ágar (MSA) (Gold *et al.*, 1973) acrescido ou não de eritromicina (erm, 10 µg/mL) ou erm, 200 µg/mL espectinomicina para seleção UAcov complementada e incubadas a 37°C, sob atmosfera de 10% CO<sub>2</sub> (Water-Jacked CO<sub>2</sub> Incubators/Cole Parmer Instruments, EUA) durante 24 h. Após o crescimento, colônias isoladas foram inoculadas em 20 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (DIFCO Labs, EUA) sem ou com eritromicina (BHlerm) (Merck Labs) e incubadas sob as mesmas condições durante 18 h. A seguir, as culturas obtidas foram diluídas em 20 mL de Meio Quimicamente Definido (MQD) acrescido ou não de erm (a uma A<sub>550nm</sub>=0,035) e incubadas a 37 °C, sob atmosfera de 10% CO<sub>2</sub> (Water-Jacked CO<sub>2</sub> Incubators/Cole Parmer Instruments, EUA) durante 24 h. O MQD foi preparado de acordo com Biswas *et al.* (2007) com algumas modificações (Anexo 2).

### 4.2 Curvas de crescimento em MQD suplementado ou não com magnésio.

As curvas de crescimento de UA159 e UAcovR foram determinadas em MQD sem e com erm, respectivamente, acrescido ou não de magnésio em diferentes concentrações (1, 5, 10 e 15 mM). A determinação do crescimento bacteriano em concentrações distintas de Mg<sup>2+</sup> foi avaliada como um controle da ativação de CovR, uma vez que altas concentrações deste cátion (10 mM) ativam *covR* em *S. mutans* (Chong *et al.*, 2008). Para isto, culturas *overnight*

das cepas em BHI (37 °C, 10% de CO<sub>2</sub>) foram diluídas até uma A<sub>550nm</sub>= 0,035 em MQD e incubadas nas mesmas condições até a metade da fase exponencial de crescimento (A<sub>550nm</sub>=1,0). A seguir, essas culturas em MQD com ou sem erm e em diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> foram incubadas nas mesmas condições durante 12 h. Alíquotas das culturas foram coletadas a cada 1 hora para a determinação das absorbâncias.

### **4.3 Ensaio *ex vivo* de crescimento e viabilidade em saliva.**

Foram coletadas amostras de saliva estimulada de 10 adultos saudáveis, para minimizar variações entre indivíduos descritas em estudos anteriores (Shelburne *et al.*, 2005 a). A salivação foi estimulada através da mastigação de um pedaço de parafilm® (Parafilm “M” Laboratory Film) e a saliva coletada em frasco mantido em banho de gelo. Um total de 5 mL de cada saliva foi acrescido de 2,5 mM de ditiotreitol (DTT). As salivas foram então clarificadas através de centrifugação (17.709 x g por 15 min, 4°C) e esterilizadas por filtração a vácuo em filtros Nalgene com poros de 0,22 µm de diâmetro (Nalgene®). Um total de 600 mL de saliva foi coletado de cada indivíduo em intervalos de 30 dias, e alíquotas dos *pools* de cada voluntário foram congeladas a -70 °C até o momento de realização dos ensaios.

As análises de crescimento e viabilidade das cepas *S. mutans* em saliva foram realizadas, como descrito por Shelburne *et al.* (2005 a), com algumas modificações. Para isto, culturas *overnight* das cepas em BHI ou BHl<sub>erm</sub> (37 °C, 10% de CO<sub>2</sub>) foram diluídas até uma A<sub>550nm</sub>= 0,035 em MQD e incubadas nas mesmas condições até a metade da fase exponencial de crescimento (A<sub>550nm</sub>=1,0). A seguir, as culturas foram diluídas 1:50 em 5 mL de saliva. Alíquotas destas suspensões foram coletadas, diluídas em série e semeadas em placas de Petri com meio BHA com ou sem erm, para determinação do número de células viáveis (ufc/mL) após 0, 3, 12, 24, 48, 72 h de incubação nas mesmas condições. Para isto, após a diluição em série, as cadeias de estreptococos foram rompidas com auxílio de sonicador (UP400S-Ultrasonic processor, Hielscher-Ultrasound Technology) em amplitude fixa (60%) por um total de 15 s (três vezes de 5 s alternadas por banho de gelo no

mesmo tempo). A seguir, 25  $\mu$ L de cada amostra foram semeados em triplicata em placas BHA/BHAerm, as quais foram incubadas a 37°C (10% CO<sub>2</sub>) durante 48 h. As condições de sonicação foram determinadas através das análises por microscopia de luz das cepas sonicadas nas diferentes condições e coradas por Gram. Foi selecionada a condição que gerou cocos isolados e/ou diplococos. As contagens de ufc foram realizadas com auxílio de um microscópio estereoscópio (Stemi DV4, ZEISS). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados com cada *pool* de saliva.

#### **4.4 Ensaio *ex vivo* de crescimento e viabilidade em sangue.**

Para determinação do crescimento em sangue, amostras de sangue foram coletadas com anticoagulante (heparina sódica) de 10 voluntários sadios (5 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, para eliminar variabilidades dependentes do gênero) (Graham *et al.*, 2005). Para a exposição das cepas *S. mutans* às amostras de sangue, culturas *overnight* das cepas em 20 mL de BHI/BHIerm (37 °C, 10% de CO<sub>2</sub>) foram diluídas até uma  $A_{550nm} = 0,035$  em MQD e incubadas nas mesmas condições até a metade da fase exponencial de crescimento ( $A_{550nm} = 1,0$ ). A seguir, 5 mL das culturas foram separadas e centrifugadas para obtenção do *pellet* de bactérias. Este foi lavado uma vez com salina, e as bactérias ressuspendidas em 5 mL de sangue heparinizado (mantido a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>), incubadas nas mesmas condições. Alíquotas destas culturas em sangue foram coletadas e diluídas em série para determinação do número de células viáveis (ufc/mL) após 0, 1, 2, 3, 24, 48, 72 h de incubação. Para isto, as cadeias de estreptococos foram rompidas com auxílio de sonicador (UP400S-Ultrasonic processor, Hielscher-Ultrasound Technology) em amplitude fixa (60%) por um total de 15 s (três vezes de 5 s alternadas por banho de gelo no mesmo tempo). A seguir, 25  $\mu$ L de cada amostra foram semeados em triplicata em placas BHA/BHAerm, as quais foram incubadas a 37°C (10% CO<sub>2</sub>) durante 48 h. As contagens foram realizadas pelo auxílio de uma lupa (Stemi DV4, ZEISS). Pelo menos três experimentos independentes foram realizados com cada voluntário.

#### **4.5 Extração de RNA das bactérias expostas à saliva.**

Para analisar o efeito da exposição à saliva na regulação de genes que compõem o regulon de CovR em *S. mutans*, as cepas UA159 e UAcovR foram crescidas em meio líquido, como descrito no item 4.2. Amostras de 20 mL das culturas (com  $A_{550nm}=1,0$ ) foram centrifugadas e expostas à saliva por 30 e 60 min.. A seguir, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação  $3.686 \times g$ , 4 min., lavadas com PBS contendo EDTA a 0,5 M, incubadas por 5 min. com 1 mL de RNA Protect Reagent (Qiagen), ressuspendidas em 220  $\mu$ L de T.E. e congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para posterior extração de RNA. Bactérias obtidas nas mesmas condições, mas não expostas à saliva, foram utilizadas como controle.

O RNA total de bactérias expostas ou não à saliva foi purificado usando-se o kit *RNeasy* (Qiagen GmbH, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. As amostras de RNA purificado foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . A integridade das amostras de RNA foi determinada através da separação eletroforética de  $2\mu\text{L}$  de cada amostra em géis desnaturantes de agarose a 1,2% (com 1,8% de formaldeído) contendo 0,15  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de brometo de etídio, em tampão de corrida (20 mM MOPS, 5 mM acetato de sódio e 1 mM EDTA). As imagens digitais dos géis foram obtidas sob luz UV, com auxílio de sistema de captura de imagens digital *Gel logic 100 Imaging System* (Eastman Kodak Co, EUA). A presença das duas bandas definidas, correspondentes aos RNAs ribossômicos (23S e 16S) indicou integridade das amostras e a determinação da concentração e pureza das amostras de RNA foi realizada através da leitura em espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Spectrophotometer Thermo Scientific). O material foi considerado puro quando a razão entre as leituras  $A_{260nm}/A_{280nm}$  foi igual ou superior a 1,7.

#### **4.6. Condições das reações de PCR em Tempo Real**

As reações de transcriptase reversa foram realizadas com as amostras de RNAs total utilizando-se os *primers* (Invitrogen, Brasil) arbitrários

Ea1 (5'-TTTTATCCAGC-3'), Ea7 (5'-TCTTTTTTACC-3'), Es1 (5'-GCTGGAAAAA-3'), Es3 (5'-GAAGTGCTGG-3') e Es8 (5'-TGCCGATGAA-3') previamente descritos (Chia *et al.*, 2001). Para obtenção de um *pool* de cDNA a partir do RNAm total, alíquotas contendo quantidades de 5,0 µg de RNA total, foram tratadas com o sistema DNase I Amp grade (Invitrogen), para eliminar qualquer traço de DNA genômico contaminante, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram adicionados a cada amostra, 5 µL de enzima DNase, 3 µL de tampão 10x DNase e H<sub>2</sub>O DEPC qsp 30 µL, sendo as amostras incubadas durante 15 min em temperatura ambiente. A seguir, acrescentou-se a cada amostra 4 µL de solução de EDTA a 25mM e as mesmas foram incubadas a 65 °C durante 10 min, para a inativação da enzima DNase I.

As reações de transcrição reversa foram posteriormente preparadas com o sistema SuperScript III (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante. Foi realizada a mistura contendo 2 µg (Chia *et al.*, 2001) de RNA total livre de DNA, 3 µL da mistura dos *primers* arbitrários (concentração final de 2 µM para cada oligo), 2 µL de 10 mM DNTP mix e H<sub>2</sub>O DEPC qsp 26 µL. Cada mistura inicial foi aquecida a 65 °C por 5 min, e resfriada por 1 min em gelo. Um segundo microtubo, contendo 8 µL Buffer 5X, 2 µL de 0.1M DTT, 2 µL de RNase OUT (40 U/µL) e 2 µL de SuperScript III (200 U/µL) por amostra, foi preparado como solução mãe, sendo 14 µL desta solução transferidas para cada tubo resfriado. As reações de RT ocorreram com incubação a 25 °C durante 10 min, a 50 °C por 3 h e foi finalizada a 85 °C por 5 min em termociclador (Thermoblock T1, Biômetra, Alemanha). Os cDNAs obtidos foram estocados a - 20 °C, para posterior utilização nas reações de PCR quantitativo.

Como controle negativo, para assegurar a ausência de DNA contaminante nas amostras, foram conduzidos em paralelo ensaios para cada amostra de RNA tratado, sob as mesmas condições, substituindo-se 2 µL de SuperScript III (200 U/µL) por 2 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. Estas amostras foram incluídas nas reações de PCR, como controle da contaminação das amostras de RNA tratadas com DNA genômico.

## 4.7 Ensaios de PCR em Tempo Real

A partir do *pool* de cDNA obtido em uma única reação de RT, para cada tempo de cada cultura bacteriana testada, reações de PCR quantitativo foram realizadas para quantificar a expressão dos genes: *covR* (SMU.1924), *gbpB* (SMU.22), *gbpC* (SMU.1396), *lysM* (SMU.2147), *udp* (SMU.1437c), *wapE* (SMU.1091), *nadh* (SMU.1117), *murL* (SMU.2146c), *gtfB* (SMU.1004), todos estes genes foram identificados como diretamente regulados por CovR em *S. mutans* (Stipp, 2010), e os genes regulatórios *vicR* (SMU.1517), *ccpA* (SMU.1591). As funções determinadas ou hipotéticas destes genes estão listadas na Tabela 1.

Os pares de *primers* específicos utilizados neste projeto foram delineados com o auxílio do programa *Primer 3* ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)), a partir das sequências do genoma da cepa UA159 disponíveis no banco de dados de *Los Alamos National Laboratory Oral Pathogens Sequence Database* (<http://www.oralgen.lanl.gov>). A especificidade dos pares de *primers* foi confirmada através da análise de BLAST, contra o genoma da cepa *S. mutans* UA159 e análise do tamanho dos produtos de amplificação. As sequências e principais características dos *primers* utilizados neste estudo estão indicadas na Tabela 2. Como gene de referência, foi testado inicialmente *16SrDNA*, o qual codifica rRNA da menor subunidade ribossômica de bactérias. A expressão deste se mostrou constante nas diferentes fases de crescimento planctônico e na exposição ou não à saliva, sendo selecionado como gene de referência.

Tabela 1: Genes identificados como parte do regulon de CovR em *S. mutans*

Genes		Função provável *
Número de acesso no GenBank	Nome utilizado neste proteto	
SMU.1117	<i>nadh</i>	NADH oxidase, piridina nucleotídeo dissulfeto oxidoreductase.
SMU.1924	<i>covR</i>	Regulador de resposta GcrR (CovR) para proteína ligadora de glucano C.
SMU.22	<i>gbpB</i>	Proteína ligadora de glucano B, possível hidrolase do peptideoglicano.
SMU.1396	<i>gbpC</i>	Proteína ligadora de glucano C.
SMU.2147c	<i>lysM</i>	Proteína de parede celular com domínio lysM, com possível função de união ao peptideoglicano e lise de parede celular.
SMU.1437c	<i>udp</i>	Possível UDP-N-acetilglucosamina 2-epimerase, cataliza a interconversão de UDP-N-acetilglucosamina e UDP-N-acetilmanosamina.
SMU.1091	<i>wapE</i>	Possível proteína de parede celular (WapE), encontra-se ancorada a membrana celular.
SMU.2146c	<i>murL</i>	Proteína com domínio tipo transglicosilase, relacionado à biossíntese de parede celular.
SMU.1591	<i>ccpA</i>	Proteína A de controle catabólico.
SMU.1517	<i>vicR</i>	Regulador de resposta VicR.
SMU.1004	<i>gtfB</i>	Possível proteína de biossíntese de parede

\*A função provável dos genes foi identificada através de análises de BLAST das sequências protéicas e pesquisa de domínios funcionais.

<b>Gene</b>	<b>Nome do primer</b>	<b>Seqüência (5'-3')</b>	<b>Tamanho do produto</b>
16SrDNA	16SRNAF	CGGCAAGCTAATCTCTGAAA	190pb
	16SRNAR	GCCCCTAAAAGGTTACCTCA	
<i>Nadh</i>	nadhF	AAGGAAAGCACCATACGGA	174pb
	nadhR	GAATTAGCATTCCGGAGAACTG	
<i>covR</i>	covRF	ACGAAATATGGCACGAACAC	185bp
	covRR	CAGAGATGGACGGGTATGAA	
<i>gpbB</i>	gpbBF	CAACAGAAGCACAACCATCA	151 pb
	gpbBR	TGTCCACCATTACCCCAGT	
<i>gpbC</i>	gpbCF	TGTAGCTGTTGTGCGAAAGTCA	179 pb
	gpbCR	CCTGTGCTTTGTTATCTGCAT	
<i>lysM</i>	lysMF	TTATCAGAGATTGCTTCAACACA	175 pb
	lysMR	CTGAGGTTTCTGCTTCATTTATC	
<i>Udp</i>	udpF	GCAAATACAGAGCGTATCCATC	189 pb
	udpR	TAAAGTCCCTGCTGCTACTCC	
<i>wapE</i>	wapEF	TATTCCTGTGCCTTCTGTTGA	187 pb
	wapER	GCCTTCTTGACTTTTGGATTG	
<i>murL</i>	murLAF	AATCTGTTCTTGCTCACACTGC	145 pb
	murLR	ACATTATCAGTTGGTTCAGTTGCT	
<i>ccpA</i>	ccpAF	AAATCGGCTGACTGATAGATGT	155 pb
	ccpAR	TTATGTTGCTGAGGATGAGTTG	
<i>gtfB</i>	gtfBF	CGAAATCCCAAATTTCTAATGA	197 pb
	gtfBR	TGTTTCCCAACAGTATAAGGA	
<i>vicR</i>	vicF	AGTGGCTGAGGAAAATGCTT	163 pb
	vicR	CATCACCTGACCTGTGTGTG	

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados neste estudo

Para a quantificação dos transcritos de cada gene teste, reações em tempo real contendo cDNA (30 ng), 30  $\mu$ M de cada par de *primer* e *SYBR-Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) em volume total de 20  $\mu$ L. Através do sistema PCR quantitativo StepOne (Applied Biosystems), cada ciclo térmico de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95 °C por 10 min. seguida de 45 ciclagens de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento por 15 s e extensão a 72 °C por 30 s. Os ensaios de qPCR foram realizados em duplicata, a partir de amostras cDNA obtidas em dois experimentos independentes. Como um dos controles negativos da reação, misturas sem cDNA foram incluídas para assegurar a ausência de DNA contaminante. Em cada corrida realizou-se, em duplicata, uma curva de amplificação de DNA em quantidades crescentes (0,003; 0,03; 0,3; 3 e 30 ng). Os valores de expressão de cada gene teste foram normalizados pelo gene 16S rRNA seguindo o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001).

#### **4.8 Análises dos resultados**

As comparações entre as curvas de crescimento ( $A_{550nm}$ ) e/ou viabilidade ( $\log_{10}$  do número de ufc/mL) em saliva, sangue ou meio de cultura foram comparadas entre o mutante UAcov e UA159. As unidades relativas de expressão dos genes *covR* (SMU.1924), *gbpB* (SMU.22), *gbpC* (SMU.1396), *lysM* (SMU.2147), *udp* (SMU.1437c), *wapE* (SMU.1091), *nadh* (SMU.1117), *murL* (SMU.2146c), *gtfB* (SMU.1004), *vicR* (SMU.1517), *ccpA* (SMU.1591) sob exposição de saliva durante 30 ou 60 minutos, em relação ao MQD, foram comparadas para cada cepa. As comparações dos números de células viáveis ( $\log$  ufc/mL) nas diferentes fases de crescimento e as unidades relativas de expressão dos diferentes genes testados foram comparados entre diferentes condições para cada cepa, utilizando-se análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Mann-Whitney), com auxílio de programa SigmaStat. Diferenças significativas entre os grupos foram consideradas para valores de p inferiores a 0,05.

## 5. Resultados

### 5.1. A inativação de CovR afeta o crescimento planctônico

Nas condições utilizadas neste estudo, comparamos as curvas de crescimento de UA159 e UAcov em Meio Quimicamente Definido (MQD). Como mostrado na Fig. 1, o mutante UAcovR atingiu a fase estacionária mais rapidamente do que UA159 e limitou o crescimento planctônico total do mutante gerando uma absorbância final inferior à da cepa selvagem. A absorbância da cepa selvagem UA159 foi de  $A_{550nm}=1,871$  já a do mutante UAcovR foi de  $A_{550nm}= 1,636$ .

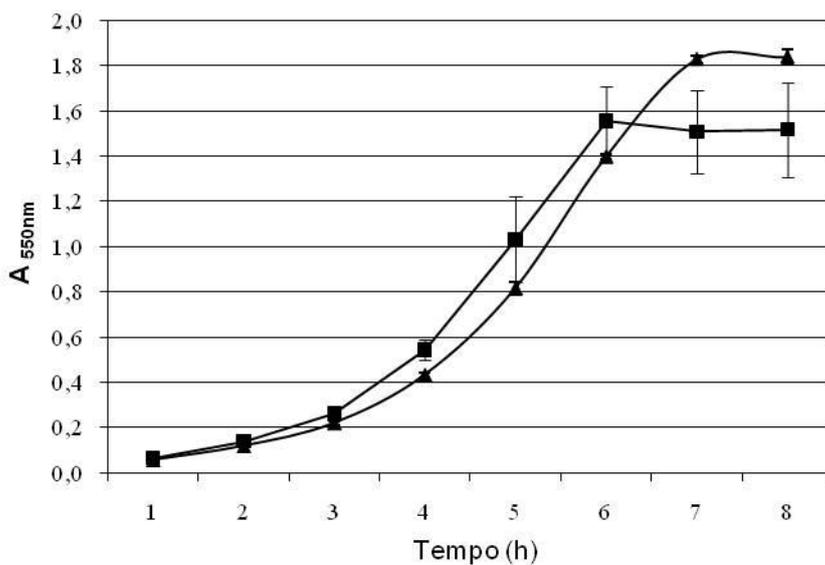


Figura 1. Curva de crescimento em MQD de *S. mutans* UA159 (-▲-) e mutante UAcovR (-■-). Os pontos indicam média de três experimentos independentes. As barras indicam desvio padrão.

## 5.2 O crescimento planctônico de UA159 e UAcovR em meio quimicamente definido não é afetado pela presença de magnésio.

Devido altas concentrações de magnésio ativar a expressão do gene *covR*, investigamos o efeito de concentrações crescentes de  $Mg^{+2}$  no padrão de crescimento planctônico das cepas selvagens e mutante. Como ilustrado na Figura 2, as curvas de crescimento de UA159 foram praticamente idênticas entre meios com diferentes concentrações de  $Mg^{+2}$ . Também não foram observadas diferenças significativas no crescimento de UAcovR.

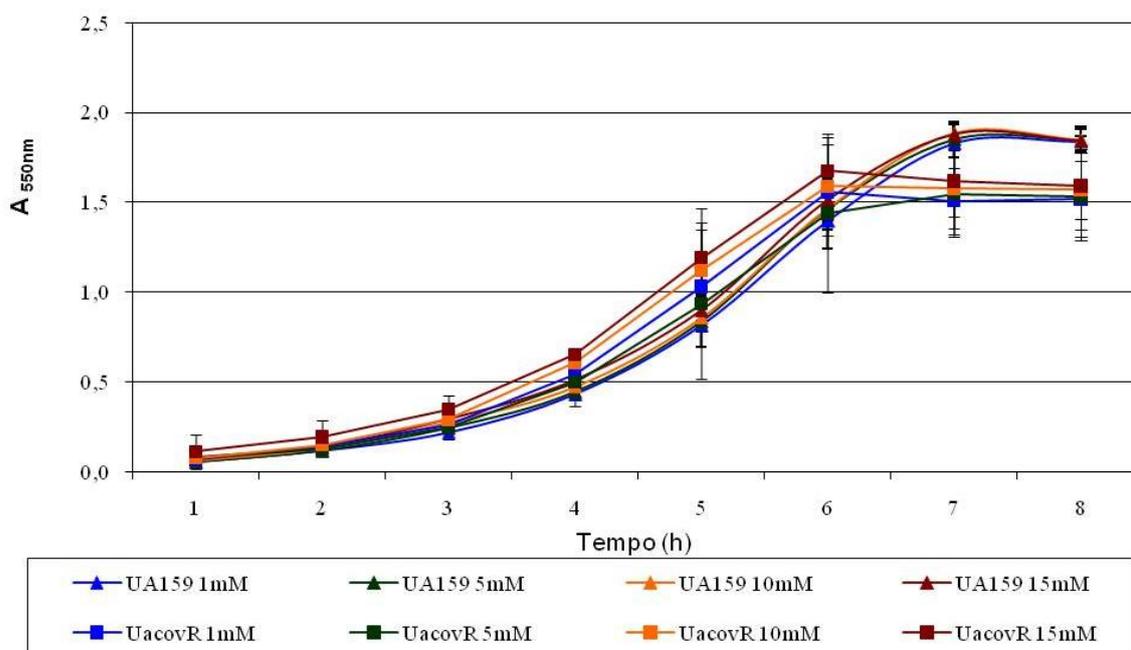


Figura. 2. Curvas de crescimento das cepas UA159 (-▲-) e UAcovR (-■-) em MQD com concentrações crescentes de  $Mg^{+2}$ . Os pontos indicam médias de três experimentos independentes. As barras indicam os desvios padrões.

### **5.3 A inativação de *covR* afeta a viabilidade de *S. mutans* em saliva humana.**

Curvas de viabilidade do mutante *covR* (UAcovR) e da cepa selvagem (UA159) em *pools* de saliva de seis voluntários saudáveis foram realizadas. Pouca ou nenhuma redução nos níveis de bactérias viáveis de UA159 foi observada nas amostras salivares durante o período de 96 h de exposição. Diferentemente, UAcovR sofreu claras reduções na viabilidade em todas as amostras salivares testadas, sendo estas significativas a partir de 48 a 72 h de exposição à saliva (Fig. 3). Ao final de 96 h de exposição, reduções de 4 a 5 vezes no log de ufc/mL foram observadas em UAcovR em comparação com a cepa selvagem, nos 6 voluntários testados. Curvas de viabilidade do mutante complementado foram realizadas para confirmarmos que as reduções na viabilidade em saliva foram decorrentes da inativação de *covR* (Fig. 4).

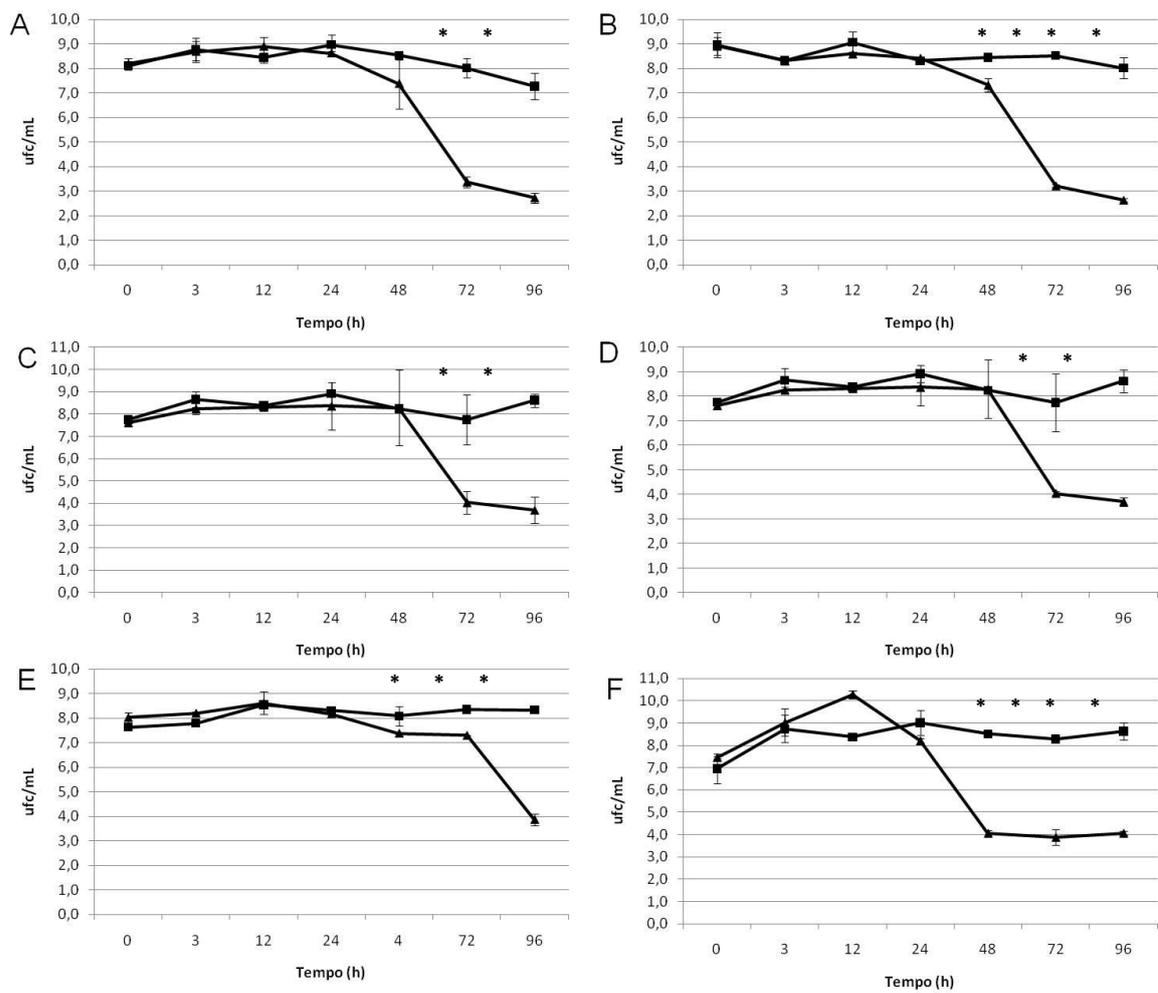


Figura. 3. Curvas de viabilidade das cepas UA159 (-■-) e UAcovR (-▲-) em saliva. Curvas foram obtidas de *pools* de saliva de seis voluntários (A a F). Os pontos representam médias de 3 experimentos independentes, as barras indicam os desvios padrão. Diferenças entre as cepas foram testadas através do teste de Mann-Whitney: \*  $p < 0.01$ .

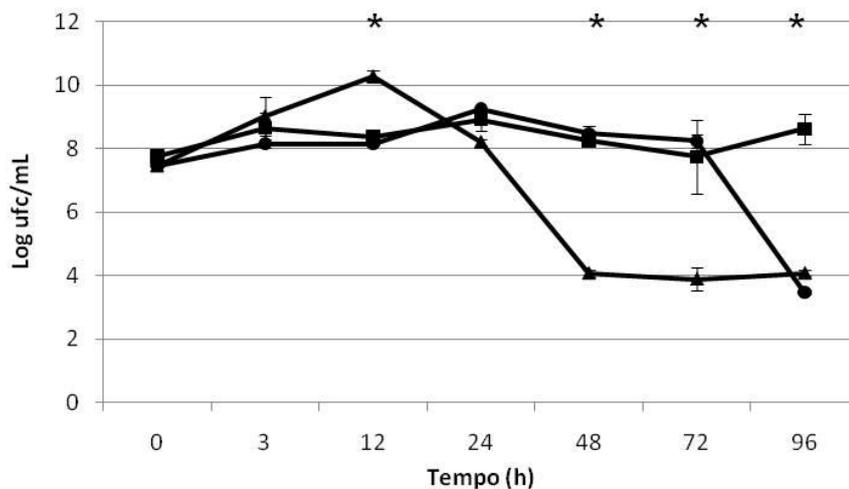


Figura 4. Curvas de viabilidade das cepas UA159 (-■-), UAcovR (-▲-) e UAcovR complementado com gene *covR* (UAcovR::*covR*) (-●-) obtidas em saliva do voluntário F. Os pontos representam médias de três experimentos independentes, as barras indicam os desvios padrão. A cepa UA159 e UAcovR::*covR* tiveram comportamento semelhante. Diferenças entre a mutante UAcov e as cepas selvagem ou complementada foram estatisticamente significantes (Mann-Whitney: \*  $p < 0.01$ ).

#### 5.4 A inativação de *covR* afeta a viabilidade de *S. mutans* em sangue humano

Curvas de viabilidade do mutante *covR* (UAcovR) e da cepa selvagem em sangue de seis voluntários saudáveis foram realizadas e comparamos a viabilidade de UAcovR com a cepa selvagem. A Figura 5 ilustra as curvas de viabilidade destas cepas em amostras de sangue de seis voluntários. Reduções mais intensas dos números de ufc/mL foram observadas em UAcovR comparado à UA159 em sangue de seis voluntários. Entretanto, os padrões das curvas de viabilidade variaram entre os voluntários, o que pode ser resultado de diferenças nos componentes de defesa inato e adaptativo. Como esperado, ao final de 72 h de exposição ao sangue, os números de ufc/mL foram semelhantes entre as cepas, indicando ser inviável a sobrevivência bacteriana prolongada às condições de estresse nutricional, biofísicas e de defesa do sangue.

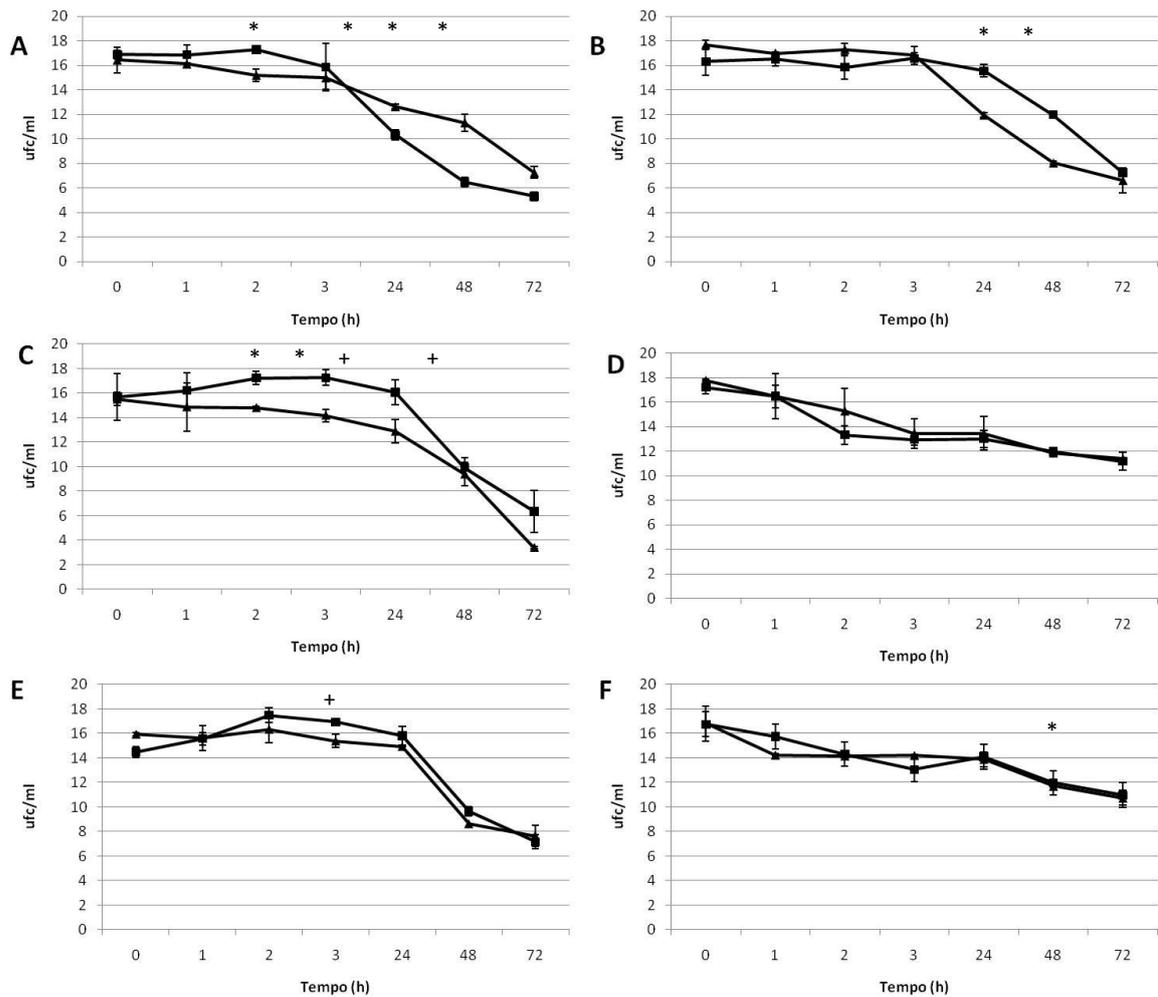


Figura. 5. Curvas de viabilidade das cepas UA159 (-■-) e UAcovR (-▲-) em sangue. Curvas foram obtidas a partir do sangue de seis voluntários (A a F). Os pontos representam médias de 3 experimentos independentes, as barras indicam os desvios padrão. Diferenças entre as cepas foram testadas através do teste de Mann-Whitney: +  $p < 0.05$ ; \*  $p < 0.01$ .

### 5.5 Extração de RNA nas cepas expostas à saliva.

Para investigar o efeito da exposição à saliva na ativação de CovR, foram realizadas análises da expressão de genes regulados por CovR após exposição bacteriana a este fluido. Para isto, foram extraídas amostras de RNA de bactérias de 20 mL de suspensões em saliva incubadas por 30 e 60 min.

Além disto, amostras bacterianas não expostas à saliva também foram analisadas como controle. A Figura 6 ilustra um gel de agarose formoldeído, no qual foram aplicados 2 µL de amostras do RNA extraído de bactérias previamente tratadas com saliva. As concentrações de RNA total de bactérias expostas à saliva foram realizadas com o auxílio de espectrofotômetro (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

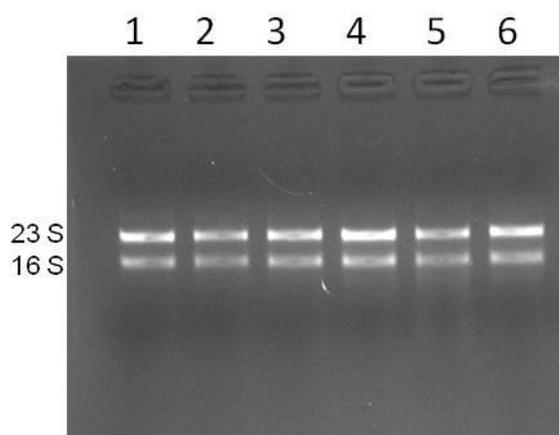


Figura 6. Padrão típico do RNA extraído das cepas UA159 (1, 2, 3) e UAcovR (4, 5, 6) expostas à saliva nos tempos de 0, 30, 60 min. respectivamente, separado em gel desnaturante de agarose a 1,2%. A presença de duas bandas bem definidas referentes aos RNAs expressos em maior quantidade indicando a integridade das amostras.

## 5.6 Ensaios de PCR em Tempo Real.

As amostras de RNA apresentaram contaminantes de DNA em quantidades irrelevantes, os quais foram eliminados com sucesso após tratamento com DNase, dados não apresentados. As reações de transcrição reversa foram posteriormente preparadas com o sistema SuperScript III (Invitrogen). Posteriormente realizamos ensaios de PCR-quantitativo com o par de *primers* específico para o gene *16SrDNA* que comprovaram a ausência de produtos de amplificação originados de contaminantes de DNA genômico, dados não apresentados.

Em seguida avaliamos as variações na expressão de genes *covR* (quando presente) e de genes reguladores *ccpA* e *vicR* nas cepas UA159 (A) e UAcovR (B) após tratamento com saliva por 30 e 60 min (Fig. 7). Os valores de expressão foram obtidos em três experimentos independentes. Nesta figura, observa-se que a transcrição do gene *covR* na cepa selvagem UA159 tratada com saliva durante 30 min. sofreu uma queda nos três experimentos independentes. A média da queda nestes experimentos foi de cerca de 7 vezes em relação a bactérias não expostas à saliva. Já para 60 min de exposição à saliva, as quedas dos níveis de transcritos de *covR* foram maiores, média cerca de 30 vezes (Fig. 7). Estes dados sugerem que a expressão de *covR* é inibida em *S. mutans* em resposta ao contato inicial com saliva. A expressão de outros genes reguladores testados (*ccpA* e *vicR*) sofreram pequenas alterações nas cepas selvagem e mutante em resposta aos tratamentos com saliva (Fig. 7).

Genes que fazem parte do regulon de CovR e que mostraram uma maior modificação na expressão em resposta à saliva tanto para a cepa selvagem UA159 como para UAcovR foram os genes *gtfB* e *gbpC* (Fig. 8). Uma queda de aproximadamente 2,5 vezes nos transcritos de *gtfB* foram observados em UA159, após 30 min. de contato com saliva. Após 60 min. de exposição à saliva, observamos uma queda de aproximadamente 14 vezes na atividade deste mesmo gene. Diferentemente, na cepa mutante UAcov observamos uma queda um pouco maior dos transcritos de *gtfB* após 30 min. (3,6 vezes) e 60 min. (18 vezes) de tratamento com saliva (Fig. 8). Entretanto, maior variabilidade entre experimentos foram observadas para a cepa mutante.

Para *gbpC* a exposição de UA 159 à saliva por 30 min. promoveu uma queda de aproximadamente 2 vezes na expressão de *gtfC* (comparada às cepas não expostas à saliva). Após 60 min de exposição à saliva, observamos uma queda de aproximadamente 5,5 vezes. Diferentemente, na cepa mutante UAcov, observamos uma queda um pouco maior dos transcritos de *gbpC* após 60 min. de tratamento com saliva (aproximadamente 12 vezes) (Fig. 8). A expressão dos genes envolvidos na interação bacteriana com glucanos e/ou biogênese de parede celular (*gbpC*, *wapE*, *udp*, *murL*, *nadH* e *lysm*) sofreram

menor influência da exposição à saliva, comparados à *gtfB*, tanto em UA159 como UAcovR (Tabela 3).

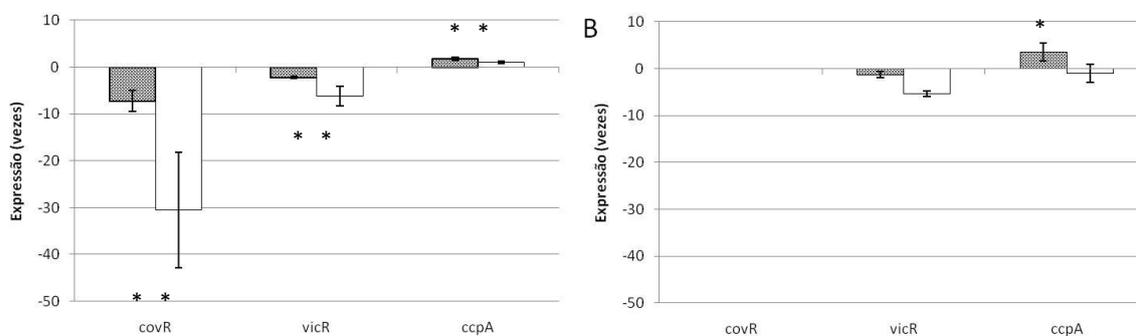


Figura. 7 Análises de RT-PCR quantitativo das mudanças na expressão do genes reguladores *covR*, *vicR*, *ccpA* em resposta ao contato com saliva durante 30 (barras escuras) e 60 minutos (barras brancas). Três experimentos independentes foram realizados para as cepas UA159 (A) e UAcov (B). As colunas representam as médias de três experimentos independentes das mudanças na quantidade de transcritos nas bactérias expostas à saliva em relação a bactérias das mesmas culturas antes do tratamento com saliva. As barras indicam os desvios padrão. Diferenças entre os tratamentos (saliva por 30 e 60 min versus sem saliva), para cada cepa foram testadas usando-se o teste de ANOVA seguida comparações por pares (Tukey): \*  $p < 0.05$ .

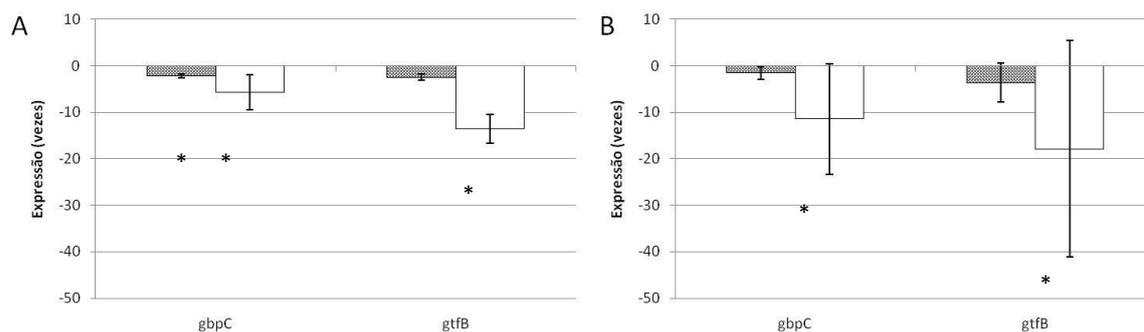


Figura. 8 Análises de RT-PCR quantitativo das mudanças na expressão dos genes do regulon de CovR *gbpC* e *gtfB* em resposta ao contato com saliva durante 30 (barras escuras) e 60 (barras brancas) minutos, para a cepa UA159 (A) e UAcov (B), em três experimentos independentes. As colunas representam as mudanças na quantidade de transcritos nas bactérias expostas à saliva em relação a bactérias das mesmas culturas antes do tratamento com saliva. As barras indicam os desvios padrão dos ensaios em triplicata. Diferenças entre as cepas foram testadas através do teste de Mann-Whitney: \*  $p < 0.05$ .

Tabela 3. Valores de expressão gênica expressos em número de vezes em relação aos controles (cepas não expostas à saliva) após diferentes tempos de exposição à saliva para as cepas UA159 e UAcov.

Genes alvos	UA159		UAcov	
	30 min.	60 min.	30 min.	60 min.
<i>gbpB</i>	-2,5	-5,3	-1,5	-3,2
<i>wapE</i>	-3,4	-7,8	-1,3	-1,5
<i>Udp</i>	-1,3	-4,1	-1,8	-5,1
<i>murL</i>	-2,7	-5,4	-1,5	-4,2
<i>Nadh</i>	-1,0	-1,9	1,4	-1,9
<i>lysM</i>	-2,0	-5,1	-1,4	-4,2

## 6. Discussão

Estudos prévios demonstram que a inativação de *covR* afeta o crescimento planctônico em meio BHI e o crescimento em biofilmes de *S. mutans* (Biswas & Biswas., 2006; Stipp *et al.*, 2008; Stipp, 2010). Para confirmar a influência de *covR* no crescimento planctônico em outras condições experimentais, comparamos as curvas de crescimento de UA159 e o mutante UAcov em MQD. Como ilustrado na Fig. 1, a cepa mutante atingiu mais rapidamente a fase exponencial em comparação a cepa selvagem. Entretanto, UAcov atingiu uma densidade celular significativamente menor do que a da cepa selvagem. Macroscopicamente, culturas planctônicas de UAcov demonstraram a formação de grumos e a precipitação bacteriana sob microaerofilia (10% de CO<sub>2</sub>), diferente da cepa selvagem mantidas nas mesmas condições, a qual demonstrou suspensão homogênea. Estudos anteriores realizados com mutantes *covR* em outras cepas de *S. mutans* não descrevem o crescimento planctônico (Biswas & Biswas, 2006; Idone *et al.*, 2003). Além disso, mutantes *covR* não demonstraram alterações nas morfologias das colônias obtidas em culturas em ágar Todd-Hewitt com 0,2% de extrato de levedura e 1% de sacarose (Biswas & Biswas, 2006), mas a morfologia colonial alterada foi observada em cepa mutante *covR*, quando cultivada em MSA (Idone *et al.*, 2003).

As alterações de crescimento planctônico observadas neste trabalho podem ser decorrentes de alterações na expressão de genes envolvidos nos processos de biogênese de parede celular. Análises comparativas dos transcriptomas das cepas UA159 e UAcov utilizadas neste estudo, indicaram que CovR é um repressor de genes que codificam proteínas com provável função na biogênese da parede celular (Stipp *et al.*, 2010). Estes incluem *lysM* (SMU.2147c), *udp* (SMU.1437), *wapE* (SMU.1091), *murL* (SMU.2146) e *gbpB* (SMU.22). Em outras espécies de estreptococos (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*), não há descrição de alterações no crescimento planctônico em cepas mutantes de *covR* (Gryllos *et al.*, 2001, Lamy *et al.*, 2004).

Em *S. pyogenes*, o sistema CovRS é ativado *in vitro* em resposta a altas concentrações de  $Mg^{2+}$  (~15 mM), desencadeando o aumento de expressão de diversos genes de virulência reprimidos por CovR (Gryllos *et al.*, 2003; Gryllos *et al.*, 2008). Concentrações baixas de  $Mg^{2+}$  presentes nas mucosas e fluidos extracelulares do corpo humano manteriam, portanto, a repressão dos genes de virulência regulados por CovR. Esta hipótese é compatível com os dados de que a exposição de *S. pyogenes* ao sangue durante 30 min. promove redução da expressão de *covR*, o qual é auto-regulado por CovRS (Graham *et al.*, 2005). Também em *S. mutans*, concentrações de 10 mM de  $Mg^{2+}$  ativam a expressão de *covR*, sugerindo que este gene também seja auto-regulado por CovR (Chong *et al.*, 2008). Neste projeto, investigamos o efeito de concentrações crescentes de magnésio (1, 5, 10, 15 mM  $Mg^{2+}$ ) no padrão de crescimento planctônico das cepas selvagens e mutante em MQD. Como ilustrado na Fig. 2, as curvas de crescimento de UA159 e UAcov foram praticamente idênticas entre meios com diferentes concentrações de magnésio, demonstrando, pouca influência da presença deste cátion no crescimento destas cepas.

Eventos iniciais para o estabelecimento de *S. mutans* nos biofilmes bucais implicariam a adaptação, sobrevivência e/ou crescimento de *S. mutans* em saliva e conseqüentemente aos fatores de defesa presentes neste fluido humano. Entretanto, pouco se sabe sobre fatores que viabilizam a sobrevivência de *S. mutans* em saliva e a relação destes com a capacidade desta espécie em colonizar e se estabelecer na microbiota bucal. Em *S. pyogenes*, o SDC CovRS reprime diversos fatores importantes para evasão de mecanismos de defesa do hospedeiro e para colonização de sítios das mucosas de humanos, os quais incluem o operon *has* envolvido na síntese de cápsula de ácido hialurônico. Este sistema também reprime a expressão e secreção de proteínas de células associadas à superfície de GAS (Gryllos *et al.*, 2003). Foi demonstrado que a expressão do operon *has* é estimulada em sangue de camundongos infectados e outros genes de virulência regulados negativamente pelo *covRS* em humanos, sugerindo a importância do sistema CovSR na resposta bacteriana a fatores do hospedeiro (Graham *et al.*, 2005;

Gryllos *et al.*, 2001). Comparações dos transcriptomas entre a cepa de GAS sorotipo M1 e respectivo mutante *covR*, demonstram que a exposição da cepa mutante *covR* ao sangue comparada ao selvagem promoveu aumento significativo da transcrição de 36 genes, incluindo-se genes de virulência, catabolismo e biossíntese de ácido hialurônico da cápsula. Assim, o SDC CovSR parece desempenhar um papel importante na virulência e adaptação metabólica de GAS ao sangue (Graham *et al.*, 2005).

Em *S. mutans* não foram ainda identificados e/ou caracterizados mecanismos de evasão a fatores de defesa do hospedeiro. Entretanto, estudos de bacteremia em modelos animais indicam que *S. mutans* é capaz de sobreviver e/ou crescer em sangue humano, por períodos longos (de pelo menos 4 dias) (Nakano *et al.*, 2006), o que sugere que *S. mutans* expresse funções de evasão a componentes do sangue ainda não identificados. Os dados obtidos neste estudo sugerem que CovR não desempenhe papel significativo no crescimento e/ou viabilidade em sangue humano (Fig. 5), embora estudos prévios realizados pelo nosso grupo indiquem que a inativação de *covR* promove resistência de *S. mutans* à fagocitose por células polimorfonucleares (PMN) de sangue humano (Vizoto *et al.*, 2009). Diferenças evidentes foram observadas nas curvas de viabilidade de ambas as cepas, quando amostras de sangue de diferentes voluntários foram comparadas. Como ilustrado na Fig. 5, para o sangue dos voluntários A e B foram observadas quedas mais acentuadas na viabilidade bacteriana nas primeiras 24 h de incubação em sangue. Por outro lado, para os voluntários C e E a queda maior na viabilidade foi após 24 h (entre 24 e 48 h de exposição), enquanto que para os voluntários D e F, reduções menores na viabilidade foram observadas até 72 h de exposição ao sangue. Assim, é possível que variações nos componentes celulares e humorais de defesa do sangue entre os voluntários tenham influenciado na sobrevivência de *S. mutans*. Análises comparativas dos componentes do sangue de cada voluntário talvez forneçam informações importantes a este respeito.

É possível que os ortólogos de CovR tenham evoluído entre as diferentes espécies de *Streptococcus* para regular funções de virulência específicas de cada espécie e seus respectivos nichos primários de colonização e infecção. Existem diversas diferenças entre os regulons de CovSR dentre as espécies de GAS e GBS. Em GAS, estima-se que CovR regule 15% dos seus genes, e atue principalmente como um repressor (Graham *et al.*, 2002). Por outro lado, em GBS, CovR atua tanto como um repressor como um indutor de diferentes genes de virulência (Lamy *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2008). O presente estudo, é o primeiro a identificar em *S. mutans* a presença de fator regulador envolvido na viabilidade de *S. mutans* em saliva. Como ilustrado na Fig. 3, a cepa selvagem UA159 é capaz de sobreviver e/ou crescer em saliva por períodos longos (pelo menos 4 dias), enquanto que o mutante UAcov apresenta uma queda significativa na viabilidade a partir do primeiro dia de exposição à saliva, indicando um novo papel de CovR na virulência de *S. mutans*. Além disto, a complementação do mutante UAcov com um plasmídeo replicativo contendo uma cópia do gene *covR*, foi capaz de restaurar a viabilidade do mutante em níveis semelhantes ao da cepa selvagem durante 72 h (Fig. 4). Outro dado importante, é que as curvas de viabilidade das cepas mutantes e selvagens observadas em saliva foram semelhantes entre os voluntários, indicando que CovR seja importante para sustentar o crescimento sob condições salivares comuns entre humanos.

Estudos prévios indicam que *S. pyogenes* são capazes de sobreviver em saliva humana por períodos de mais de 28 dias (Shelburne *et al.*, 2005 a). O crescimento de *S. mutans* em saliva não foi ainda bem investigado. Há um estudo no qual *S. mutans* foi cultivado por 24 h em saliva humana acrescida ou não de glicose (de Jong *et al.*, 1984). Neste trabalho, verificou-se que *S. mutans* apresenta pobre crescimento em saliva, embora no estudo realizado por de Jong *et al.* (1984) o *S. mutans* foi capaz de crescer em saliva acrescida de glicose como fonte de energia. Dados da literatura indicam que a presença de saliva dificulta a formação de biofilme por *S. mutans*, provavelmente porque componentes salivares bloqueiam adesinas de superfície da bactéria impedindo a interação com a superfície (Ahn *et al.*,

2008). Por outro lado, a capacidade de persistir em saliva é possivelmente importante para a transmissibilidade de *S. mutans* entre indivíduos (Bowden & Haminton, 1998).

*S. mutans* é um dos principais patógenos de cárie, pois é capaz de colonizar as superfícies dos dentes e aumentar em proporção no biofilme dentário através da interação com uma matriz extracelular de glucanos sintetizada a partir da sacarose (revisado por Smith e Mattos-Graner, 2008). Este processo possivelmente influencia diversos fatores que modulam a ecologia do biofilme dentário, como a densidade celular, difusão de nutrientes e metabólitos e evasão de mecanismos de defesa do hospedeiro. A síntese e interação de *S. mutans* com a matriz extracelular de glucanos envolve a expressão de alguns fatores de virulência, como as proteínas GtfB/C, GbpC e GbpB (Banas & Vickerman, 2003; Duque *et al.*, 2011), codificadas por genes diretamente regulados pelos SDCs VicKR e CovR (Senadheera *et al.*, 2005; Senadheera *et al.*, 2007; Biswas *et al.*, 2007; Stipp *et al.*, 2009). Contudo não se sabe a importância destes genes na capacidade de *S. mutans* sobreviver e/ou crescer em saliva. Nesta Bactéria, CovR também regula diretamente outras proteínas de superfície com possível função na biogênese de parede celular [*wapE* (SMU.1091), *udp* (SMU.1437c), *lysM* (SMU.2147c), *murL* (SMU.2146)] e *nadH* (SMU.1117), o qual codifica uma NAD oxidase com possível papel na resposta ao estresse oxidativo (Stipp, 2010). Além destes genes do regulon de CovR, investigamos ainda a expressão do regulador de resposta *ccpA* (SMU.1591), o qual codifica uma proteína A de controle catabólico descrita como importante para virulência, persistência e estabelecimento de *S. mutans* em meio BHI (Abranches *et al.*, 2008). Em *S. pyogenes* *ccpA* parece regular muitos dos mesmos genes que são regulados por *covR*, sendo importante para regular a expressão de diversos genes em GAS relacionados à virulência e metabolismo, contribuindo para a adaptação bacteriana em diferentes condições ambientais (Shelburne *et al.*, 2010). O regulador VicR de *S. mutans* também regula positivamente, diversos genes do regulon de CovR em *S. mutans* (Senadheera *et al.*, 2005; Biswas & Biswas, 2006; Stipp *et al.*, 2010).

Neste estudo, verificamos que o tratamento de *S. mutans* com saliva humana, promove reduções significativas na expressão de *covR* (Fig. 7). A extensão das quedas nas quantidades de transcritos *covR* são ainda dependentes do tempo de tratamento com saliva, sendo superiores em bactérias tratadas por 60 min. comparadas ao tratamento por 30 min. Diversas glicoproteínas salivares promovem agregação bacteriana e bloqueiam componentes de superfície (Ahn *et al.*, 2008). Independentemente das variações inter-experimentos, observamos em todos os ensaios que o tratamento da cepa selvagem *S. mutans* UA159 com saliva promoveu reduções significativas na expressão de *covR*, indicando que este regulador está envolvido na resposta fisiológica de *S. mutans* à saliva. Em GAS, a expressão de *covR* é inibida em contato com o sangue por 30 min. (Graham *et al.*, 2005), mas não em resposta ao contato com saliva (Shelburne *et al.*, 2005 a). No estudo de Shelburne *et al.* (2005 b), a exposição de GAS à saliva promoveu alteração na expressão de alguns fatores de transcrição e SDC, os quais variaram dependendo do tempo de tratamento com saliva. Por exemplo, a exposição de GAS à saliva por 4 h promoveu aumento da expressão do fator de transcrição *rofA* (*spy 0124*), o qual regula a adesão de GAS a células eucarióticas. Entretanto, após período de 16 h, outros genes reguladores foram alterados, os quais incluíram genes com prováveis funções de resposta a estresses ambientais como, *perR* (*spy0187*), *spy0583*, *hrcA* (*spy1763*) e SDC *ihk-irr*, este último envolvido na resposta ao estresse oxidativo (Shelburne *et al.*, 2005 b). Não foram detectadas alterações significativas no SDC CovSR em GAS tratado com saliva, embora alterações em genes de evasão regulados por estes sistema tenham sido observadas e um papel de CovSR na adaptação fisiológica de GAS à saliva foi sugerido (Shelburne *et al.*, 2005 b). É possível que os SDC CovSR sejam importantes para as respostas iniciais ao contato com a saliva. Neste estudo, verificamos alterações na expressão de *covR* em *S. mutans* tratado com saliva por curtos períodos de tempo (30 a 60 min.). Novos ensaios serão realizados para investigar a expressão de *covR* e outros genes CovR-regulados por períodos de 24 a 72 h de exposição de UA159 à

saliva, quando quedas significativas na viabilidade do mutante UAcov são observadas.

Uma vez que CovR é um regulador negativo dos genes *gbpB* (SMU.22), *gbpC* (SMU.1396), *lysM* (SMU.2147c), *wapE* (SMU.1091), *udp* (SMU.1437c), *nadh* (SMU.1117), *murL* (SMU.2146c), *gtfB* (SMU.1004), investigamos o efeito da exposição à saliva na expressão destes genes. Entre estes, alterações significativas foram detectadas na expressão de *gtfB* após 30 e 60 min. de tratamento. Verificamos ainda diferenças significativas na expressão de *gtfB*, entre a cepas selvagem e mutante UAcov tratadas. Na cepa selvagem, o tratamento com a saliva durante 30 min. promoveu uma redução de cerca de 2,5 vezes nos transcritos de *gtfB*, acompanhada de redução de expressão de *covR*. Por outro lado, no mutante *covR*, após os 30 min. a redução foi maior de 3,6 vezes em três experimentos independentes, sugerindo que a saliva ative outros sistemas regulatórios de *gtfB* em resposta à saliva. Para a cepa selvagem tratada por 60 min. com saliva apresentou uma redução menor dos níveis de transcritos de *gtfB* redução média de 13,5 vezes do que para a cepa mutante. As diferenças entre experimentos foram grandes, para o experimento 1 e 3 observamos quedas de aproximadamente 3 e 7 vezes respectivamente, já para o experimento 2 obteve-se uma queda de 44 vezes (dados não apresentados). Diferenças entre experimentos sugerem o envolvimento de outros sistemas reguladores de *gtfB* ativados direta ou indiretamente em resposta ao contato com saliva. Estes dados são compatíveis com os estudos que indicam que *gtfB* e outros genes do regulon de CovR estão sob o controle de mais de um SDC (Senadheera *et al.*, 2005; Biswas & Biswas, 2006). Portanto, é possível que a falta da relação direta entre a redução de transcritos de *covR* com o aumento dos transcritos de genes do seu regulon seja decorrente de interações cruzadas entre mais de um sistema regulador ativado, em resposta à saliva. Os estudos que analisam a extensão do efeito da inativação de *covR* na expressão dos genes avaliados neste trabalho (*gtfB*, *gbpB*, *gbpC*, *covR*, *lysM*, *wapE*, *udp*, *nadh*, *murL*) foram realizados apenas em culturas em meios artificiais (Stipp, 2010), e é possível que outros estímulos do hospedeiro modulem a regulação destes genes. Entre

os genes do regulon de CovR em *S. mutans*, o mais intensamente regulado é o gene *gtfB* (Biswas & Biswas, 2006; Stipp, 2010). A inativação de *covR* em UA159 resulta em um aumento de 18 vezes nos níveis de transcritos da *gtfB in vitro*, o que foi ainda associado ao aumento da formação de biofilme (Stipp, 2010). No estudo de Biswas e Biswas (2006), um mutante *covR* de *S. mutans* demonstrou aumento de duas vezes na expressão de *gtfB* em culturas em meio THY (Meio Todd-Hewitt suplementado com 0,2 % de extrato de levedura). A expressão de *gtfB/C* é influenciada pelas condições nutricionais e ambientais, incluindo-se a fase de crescimento, pH, exposição à sacarose e se a bactéria cresceu na presença de biofilmes (Biswas & Biswas, 2006). Assim, a redução da expressão *gtfB* em *S. mutans* quando cultivado em meio pobre de açúcares como a saliva é compatível com a função desta enzima na reserva de substratos em condições de exposição à sacarose. É possível que CovR esteja implicado na adaptação do metabolismo de *S. mutans* às condições nutricionais salivares.

Estudos em GAS, indicam que outro fator regulador de transcrição, o regulador catabólico CcpA, parece influenciar na expressão de diversos genes do regulon de CovR em GAS (Shelburne *et al.*, 2010). CcpA é um regulador do catabolismo microbiano em diversas espécies e regula funções do metabolismo de carboidratos e da utilização de nitrogênio (Shelburne *et al.*, 2010). Em GAS, a inativação do *ccpA* promoveu reduções significativas na virulência em modelos animais e na expressão de alguns fatores de virulência regulados por CovSR. Entretanto, em meios de cultura complexos, a inativação de CcpA não influenciou significativamente a expressão de fatores de virulência (Shelburne *et al.*, 2010). A inativação de *covR* não influencia nos níveis de transcrição *ccpA* em condições laboratoriais, sugerindo que *covR* e *ccpA*, atuam sobre os mesmos fatores de virulência, porém através de sistemas independentes (Shelburne *et al.*, 2010). Neste estudo, investigamos os efeitos da exposição à saliva na expressão de *ccpA* e verificamos um aumento de cerca de 2 vezes nos transcritos de *ccpA* em UA159 em resposta à saliva. Além disto, verificamos alterações semelhantes no mutante UAcov, compatível com dados em GAS de que o sistema CovSR não regula a expressão deste regulador. Da

mesma forma, não identificamos forte influência da exposição de *S. mutans* UA159 ou mutante UAcovR na expressão de *vicR*, outro sistema regulador de fatores de virulência de *S. mutans*. Estes dados ressaltam a participação específica do regulador CovR na resposta de *S. mutans* à saliva. Comparações dos transcriptomas entre UAcov e a cepa selvagem poderão auxiliar na identificação dos genes regulados por CovR importantes para a adaptação de *S. mutans* à saliva.

## 7. Conclusões

Com base nos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que em *Streptococcus mutans*:

1. O regulador CovR é importante para a viabilidade em saliva de pessoas saudáveis.
2. O regulador CovR tem pouca influência na sobrevivência em sangue humano.
3. A atividade de alguns genes de virulência diretamente regulados por CovR, como *gtfB*, são significativamente afetados pela curta exposição à saliva e esta alteração é influenciada pela presença de CovR.
4. Genes envolvidos na biogênese de parede celular diretamente regulados por CovR não têm expressão significativamente alterada em resposta ao contato com saliva humana por curtos períodos de tempo.

## 8. Referências\*

1. Abiko, Y., M. Nishimura, and T. Kaku. Defensins in saliva and the salivary glands 2. Med. Electron Microsc. 2003; 36:247-252.
  2. Abranches, J., M. M. Nascimento, L. Zeng, C. M. Browngardt, Z. T. Wen, M. F. Rivera, and R. A. Burne. CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. Journal of Bacteriology. 2008; 190:2340-2349.
  3. Ahn, S. J., S. J. Ahn, Z. T. Wen, L. J. Brady, and R. A. Burne. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. Infection and Immunity. 2008; 76:4259-4268.
  4. Ajdic, D., W. M. McShan, R. E. McLaughlin, G. Savic, J. Chang, M. B. Carson, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 2002; 99:14434-14439.
  5. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. H. Zhang, Z. Zhang, W. Miller et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research. 1997; 25:3389-3402.
  6. Alves, A. C., R. D. Nogueira, R. N. Stipp, F. Pampolini, A. B. A. Moraes, R. B. Goncalves et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. Journal of Medical Microbiology. 2009; 58:476-481.
  7. Amerongen, A. V. and E. C. Veerman. Saliva-the defender of the oral cavity. Oral Dis. 2002; 8:12-22.
  8. Ashkenazi, M. and D. K. Dennison. A new method for isolation of salivary neutrophils and determination of their functional activity. J.Dent.Res. 1989; 68:1256-1261.
  9. Banas, J. A. and M. M. Vickerman. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. Crit Rev.Oral Biol.Med. 2003; 14:89-99.
- \* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

10. Berkowitz, R. J. and H. V. Jordan. Early Establishment of *Streptococcus Mutans* in Mouths of Infants. *Journal of Dental Research*. 1975; 54:128.
11. Berkowitz, R. J. Mutans streptococci: Acquisition and transmission. *Pediatric Dentistry*. 2006; 28:106-109.
12. Biswas, S. and I. Biswas. Regulation of the glucosyltransferase (gtfBC) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. *J.Bacteriol*. 2006; 188:988-998.
13. Biswas, I., L. Drake, and S. Biswas. Regulation of *gfpC* expression in *Streptococcus mutans*. *J.Bacteriol*. 2007; 189:6521-6531.
14. Bowden, G. H. and I. R. Hamilton. Survival of oral bacteria. *Crit Rev.Oral. Biol.Med*. 9:54-85.
15. Campbell, R. E., S. C. Mosimann, M. E. Tanner, and N. C. Strynadka. The structure of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase reveals homology to phosphoglycosyl transferases. *Biochemistry*. 2000; 39:14993-15001.
16. Caufield, P. W., G. R. Cutter, and A. P. Dasanayake. Initial Acquisition of Mutans Streptococci by Infants - Evidence for A Discrete Window of Infectivity. *Journal of Dental Research*. 1993; 72:37-45.
17. Chen P. M., Chen H. C., Ho C. T., Jung C. J., Lien H. T., Chen J. Y. *et al*. The two-component system ScnRK of *Streptococcus mutans* affects hydrogen peroxide resistance and murine macrophage killing. *Microbes.Infect*. 2008; 10 (3):293-301.
18. Chia, J. S., Y. Y. Lee, P. T. Huang, and J. Y. Chen. Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. *Infection and Immunity*. 2001; 69:2493-2501.
19. Chong, P., L. Drake, and I. Biswas. Modulation of *covR* expression in *Streptococcus mutans* UA159. *J.Bacteriol*. 2008; 190:4478-4488.
20. Churchward, G. The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Mol.Microbiol*. 2007; 64:34-41.
21. Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284:1318-1322.

22. Dale, B. A., R. Tao, J. R. Kimball, and R. J. Jurevic. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. *BMC Oral Health Suppl.* 2006; 1:S13.
23. Dalton, T. L., R. I. Hobb, and J. R. Scott. Analysis of the role of CovR and CovS in the dissemination of *Streptococcus pyogenes* in invasive skin disease. *Microb.Pathog.* 2006; 40:221-227.
24. de Jong, M. H., J. S. van der Hoeven, J. H. van OS, and J. H. Olijve. Growth of oral *Streptococcus* species and *Actinomyces viscosus* in human saliva. *Appl.Environ.Microbiol.* 1984; 47:901-904.
25. Duque, C., R. N. Stipp, B. Wang, D. J. Smith, J. F. Hofling, H. K. Kuramitsu, *et al.* Downregulation of GbpB, a Component of the VicRK Regulon, Affects Biofilm Formation and Cell Surface Characteristics of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity.* 2011; 79:786-796.
26. Freire, M. D. M., R. B. deMelo, and S. A. E. Silva. Dental caries prevalence in relation to socioeconomic status of nursery school children in Goiania-GO, Brazil. *Community Dentistry and Oral Epidemiology.* 1996; 24:357-361.
27. Gold, O. G., H. V. Jordan, and J. Vanhoute. Medium for Selective Cultivation of *Streptococcus-Mutans*. *Journal of Dental Research.* 1973; 52:171.
28. Graham, M. R., L. M. Smoot, C. A. Migliaccio, K. Virtaneva, D. E. Sturdevant, S. F. Porcella, *et al.* Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and in vivo infection modeling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2002; 99:13855-13860.
29. Graham, M. R., K. Virtaneva, S. F. Porcella, W. T. Barry, B. B. Gowen, C. R. Johnson, *et al.* Group A *Streptococcus* transcriptome dynamics during growth in human blood reveals bacterial adaptive and survival strategies. *Am.J.Pathol.* 2005; 166:455-465.
30. Gryllos, I., C. Cywes, M. H. Shearer, M. Cary, R. C. Kennedy, and M. R. Wessels. Regulation of capsule gene expression by group A *Streptococcus* during pharyngeal colonization and invasive infection<sup>6</sup>. *Mol.Microbiol.* 2001; 42:61-74.

31. Gryllos, I., J. C. Levin, and M. R. Wessels. The CsrR/CsrS two-component system of group A *Streptococcus* responds to environmental Mg<sup>2+</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003; 100:4227-4232.
32. Gryllos, I., R. Grifantini, A. Colaprico, S. Jiang, E. Deforce, A. Hakansson, *et al.* Mg(2+) signalling defines the group A streptococcal CsrRS (CovRS) regulon. *Mol.Microbiol.* 2007; 65:671-683.
33. Gryllos, I., H. J. Tran-Winkler, M. F. Cheng, H. Chung, R. Bolcome, III, W. Lu *et al.* Induction of group A *Streptococcus* virulence by a human antimicrobial peptide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2008; 105:16755-16760.
34. Hamilton, A., D. L. Popham, D. J. Carl, X. Lauth, V. Nizet, and A. L. Jones. Penicillin-binding protein 1a promotes resistance of group B *Streptococcus* to antimicrobial peptides. *Infect.Immun.* 2006; 74:6179-6187.
35. Idone, V., S. Brendtro, R. Gillespie, S. Kocaj, E. Peterson, M. Rendi *et al.* Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis. *Infect.Immun.* 2003; 71:4351-4360.
36. Jenkinson, H. F. and R. J. Lamont. Oral microbial communities in sickness and in health 1. *Trends Microbiol.* 2005; 13:589-595.
37. Jiang, S. M., M. J. Cieslewicz, D. L. Kasper, and M. R. Wessels. Regulation of virulence by a two-component system in group B *Streptococcus*. *Journal of Bacteriology.* 2005; 187:1105-1113.
38. Jiang, S. M., N. Ishmael, J. D. Hotopp, M. Puliti, L. Tissi, N. Kumar, *et al.* Variation in the group B *Streptococcus* CsrRS regulon and effects on pathogenicity. *Journal of Bacteriology.* 2008; 190:1956-1965.
39. Kohler, B. and D. Bratthall. Practical Method to Facilitate Estimation of *Streptococcus-Mutans* Levels in Saliva. *Journal of Clinical Microbiology.* 1979; 9:584-588.
40. Kozai, K., R. Nakayama, U. Tedjosongko, S. Kuwahara, J. Suzuki, M. Okada *et al.* Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and

- possibility of father-to-child transmission. *Microbiology and Immunology*. 1999; 43:99-106.
41. Kuramitsu, H. K., X. He, R. Lux, M. H. Anderson, and W. Shi. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2007; 71:653-670.
  42. Lamy, M. C., M. Zouine, J. Fert, M. Vergassola, E. Couve, E. Pellegrini *et al.* CovS/CovR of group B *streptococcus*: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol.Microbiol.* 2004; 54:1250-1268.
  43. Lemos, J. A., J. Abranches, and R. A. Burne. Responses of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr.Issues Mol.Biol.* 2005; 7:95-107.
  44. Levin, J. C. and M. R. Wessels. Identification of *csrR/csrS*, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A *Streptococcus*. *Mol.Microbiol.* 1998; 30:209-219.
  45. Lockhart, P. B., M. T. Brennan, H. C. Sasser, P. C. Fox, B. J. Paster, and F. K. Bahrani-Mougeot. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction . *Circulation*. 2008; 117:3118-3125.
  46. Madigam, M.T., Martinko J.M., Parker, J. *Microbiologia de Brock.*, São Paulo-Brasil: Prentice Hall. 2004.
  47. Marcotte, H. and M. C. Lavoie. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998; 62:71.
  48. Matsumoto-Nakano, M., K. Fujita, and T. Ooshima. Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol.Immunol.* 2007; 22:30-35.
  49. Matsumoto-Nakano, M., K. Fujita, and T. Ooshima. Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol.Immunol.* 2007; 22:30-35.
  50. Mitchell, T. J. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat.Rev.Microbiol.* 2003; 1:219-230.

51. Mereghetti, L., I. Sitkiewicz, N. M. Green, and J. M. Musser. Extensive adaptive changes occur in the transcriptome of *Streptococcus agalactiae* (group B *streptococcus*) in response to incubation with human blood. PLoS.ONE. 2008; 3:e3143.
52. Murakami, M., T. Ohtake, R. A. Dorschner, and R. L. Gallo. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. J.Dent.Res. 2002; 81:845-850.
53. Nakano, K., R. Nomura, I. Nakagawa, S. Hamada, and T. Ooshima. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. J.Clin.Microbiol. 2004; 42:198-202.
54. Nakano, K., K. Fujita, K. Nishimura, R. Nomura, and T. Ooshima. Contribution of biofilm regulatory protein A of *Streptococcus mutans*, to systemic virulence. Microbes.Infect. 2005; 7:1246-1255.
55. Nakano, K., M. Tsuji, K. Nishimura, R. Nomura, and T. Ooshima. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. Microbes.Infect. 2006; 8:114-121.
56. Nakano, K., H. Nemoto, R. Nomura, H. Homma, H. Yoshioka, Y. Shudo *et al.* Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients. Journal of Medical Microbiology. 2007; 56:551-556.
57. Nogueira, R. D., A. C. Alves, M. H. Napimoga, D. J. Smith, and R. O. Mattos-Graner. Characterization of salivary immunoglobulin A responses in children heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. Infect.Immun. 2005; 73:5675-5684.
58. Nomura, R., K. Nakano, and T. Ooshima. Contribution of glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans* to bacteremia occurrence. Arch.Oral Biol. 2004; 49:783-788.
59. Parsek, M. R. and P. K. Singh. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu.Rev.Microbiol. 2003; 57:677-701.

60. Pfaffl, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001; Vol 29, n° 900.
61. Poyart C, Pellegrini E, Marceau M, Baptista M, Jaubert F, Lamy M.C. *et al.* Attenuated virulence of *Streptococcus agalactiae* deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol Microbiol*. 2003; Sep;49 (6):1615-25.
62. Sato, E. F., T. Choudhury, T. Nishikawa, and M. Inoue. Dynamic aspect of reactive oxygen and nitric oxide in oral cavity. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2008; 42:8-13.
63. Sato, Y., Y. Yamamoto, and H. Kizaki. Construction of region-specific partial duplication mutants (merodiploid mutants) to identify the regulatory gene for the glucan-binding protein C gene in vivo in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol.Lett*. 2000; 186:187-191.
64. Senadheera, M. D., B. Guggenheim, G. A. Spatafora, Y. C. Huang, J. Choi, D. C. Hung, J. S. Treglown *et al.* A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *fff* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol*. 2005; 187:4064-4076.
65. Senadheera, M. D., A. W. Lee, D. C. Hung, G. A. Spatafora, S. D. Goodman, and D. G. Cvitkovitch. The *Streptococcus mutans* *vicX* gene product modulates *gtfB/C* expression, biofilm formation, genetic competence, and oxidative stress tolerance. *J Bacteriol*. 2007; 189:1451-1458.
66. Shelburne, S. A., III, C. Granville, M. Tokuyama, I. Sitkiewicz, P. Patel, and J. M. Musser. Growth characteristics of and virulence factor production by group A *Streptococcus* during cultivation in human saliva. *Infect.Immun*. 2005; 73:4723-4731.(a).
67. Shelburne, S. A., III, P. Sumby, I. Sitkiewicz, C. Granville, F. R. DeLeo, and J. M. Musser. Central role of a bacterial two-component gene regulatory system of

- previously unknown function in pathogen persistence in human saliva. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 2005; 102:16037-16042.(b).
68. Shelburne, S. A., R. J. Olsen, B. Suber, P. Sahasrabhojane, P. Sumby, R. G. Brennan *et al.* A Combination of Independent Transcriptional Regulators Shapes Bacterial Virulence Gene Expression during Infection. Plos Pathogens. 2010; 19;6(3):e1000817.
  69. Smith, D. J. and R. O. Mattos-Graner. Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. Curr.Top.Microbiol.Immunol. 2008; 319:131-156.
  70. Stinson, M. W., S. Alder, and S. Kumar. Invasion and killing of human endothelial cells by viridans group streptococci. Infect.Immun. 2003; 71:2365-2372.
  71. Stipp, R. N. Caracterização dos regulons de CovR e VicRK em *Streptococcus mutans* [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010.
  72. Stipp, R. N., M. J. Duncan, H. Boisvert, D. J. Smith, and R. O. Mattos-Graner. Response regulator CovR controls expression of genes for cell wall biogenesis in *Streptococcus mutans*. Mol.Microbiol. Submetido. 2009; (MMI 2009-08690).
  73. Stipp, R. N., R. B. Goncalves, J. F. Hofling, D. J. Smith, and R. O. Mattos-Graner. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gpbB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol.Immunol. 2008; 23:466-473.
  74. Tenovuo, J. Antimicrobial agents in saliva--protection for the whole body. J.Dent.Res. 2002; 81:807-809.
  75. Tsumori, H. and H. Kuramitsu. The role of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferases in the sucrose-dependent attachment to smooth surfaces: essential role of the GtfC enzyme. Oral Microbiology and Immunology. 1997; 12:274-280.
  76. van Houte, J. and J. Russo. Variable colonization by oral streptococci in molar fissures of monoinfected gnotobiotic rats. Infect.Immun. 1986; 52:620-622.

77. Vizoto, N.L., Duque, C., Stipp, R.N., Mariano, F.S., Hofling, J.F., and Mattos-Graner, R.O. Efeito da inativação dos sistemas VicKR e CovR na susceptibilidade de *Streptococcus mutans* à fagocitose por neutrófilos humanos. Anais do 25° Congresso Brasileiro de Microbiologia ISSN 2176-414X. 2009. 10-11-2009. Ref Type: Abstract.

## Anexo 1



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Influência do regulador CovR na resposta de *Streptococcus mutans* ao contato com saliva e sangue"**, protocolo nº 067/2009, dos pesquisadores Renata de Oliveira Mattos Graner e Natalia Leal Vizoto, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 07/07/2009.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Influence of the CovR regulator in *Streptococcus mutans* response in contact with saliva and blood"**, register number 067/2009, of Renata de Oliveira Mattos Graner and Natalia Leal Vizoto, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .

**Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas**  
Secretário  
CEP/FOP/UNICAMP

**Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**  
Coordenador  
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.  
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

## Anexo 2

### Meio Quimicamente Definido (MQD)

#### Solução de sais (Solução A)

58 mM $K_2HPO_4$
15 mM $K_2HPO_4$
10 mM $(NH_4)_2SO_4$
35 mM NaCl
0.1 mM $MnCl_2$
1 mM $MgCl_2$
0.2 % (wt/ vol) casein hydrolysate

Filtrar e armazenar em geladeira.

#### Solução de Aminoácidos (Solução B)

1 mM L-arginine HCl
1.3 mM L-cysteine
4 mM L-glutamic acid
0.1 mM L-tryptophan
mM P-aminobenzoic acid

Filtrar e armazenar à  $-20^\circ C$ .

#### Solução de Vitaminas BME (100X) (Sigma Aldrich Company, B6891)

Preparar as soluções A e B com água destilada.

Misturar solução A, B e Solução de vitamina BME e filtrar (0,22 $\mu$ m).