

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

JULIANNA JOANNA DE CARVALHO MORAES

**ANÁLISE DA FUNÇÃO DO SISTEMA DE DOIS COMPONENTES
VICRK NA BIOLOGIA DE *STREPTOCOCCUS SANGUINIS*.**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP para obtenção do Título de Doutor em Estomatopatologia, na Área de Estomatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata de Oliveira Mattos-Graner

Este exemplar corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna e orientada pela Prof^a. Dr^a. Renata de Oliveira Mattos-Graner.

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Gardênia Benossi – CRB – 8ª./8644

Moraes, Julianna Joanna de Carvalho, 1981 -

M791a Análise da função do sistema de dois componentes VicRK na
biologia de Streptococcus sanguinis / Julianna Joanna de
Carvalho Moraes. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Renata de Oliveira Mattos-Graner.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Genética. 2. Biofilme. 3. Endocardite bacteriana. 4.
Virulência. 5. Expressão gênica. I. Mattos-Graner, Renata de
Oliveira. II. Jorge Júnior, Jacks. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Título em Inglês: Function analysis of two-component system VicRK in
Streptococcus sanguinis biology

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Genetic. 2. Biofilm. 3. Endocarditis,
bacterial. 4. Virulence. 5. Gene expression.

Área de concentração: Estomatologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca examinadora: Renata de Oliveira Mattos-Graner [Orientador], Cristiane
Yumi Koga Ito, Ruchele Dias Nogueira, Rafael Nóbrega Stipp, José Francisco
Höfling

Data da defesa: 25-10-2011

Programa de Pós-Graduação: Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 25 de Outubro de 2011, considerou a candidata JULIANNA JOANNA DE CARVALHO MORAES aprovada.

Profa. Dra. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

Profa. Dra. CRISTIANE YUMI KOGAITO

Profa. Dra. RUCHELE DIAS NOGUEIRA

Prof. Dr. RAFAEL NOBREGA STIPP

Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HOFLING

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

A Deus, fonte de toda a sabedoria, pela a oportunidade de viver, a possibilidade de realizar esta pesquisa e a felicidade de nascer em uma família tão maravilhosa.

Aos meus pais, Antônio Oliveira de Moraes e Evânia Maria Souza de Carvalho, que sempre se fizeram presentes na distância. Ensinarão-me valores imprescindíveis para a vida como a honestidade, sinceridade, dentre tantos outros. Grandes incentivadores e provedores de meus sonhos.

Aos meus irmãos, Antonio Oliveira de Moraes Filho, Marianna de Carvalho Moraes e Ana Cláudia Torres Correia de Moraes, que são meus amigos mais antigos. É um privilégio tê-los em minha vida.

Ao meu noivo, Mateus de Campos Baldin, por toda a compreensão com minha ausência constante e com o namoro nada convencional que temos, além de todo o incentivo à minha profissão e o amor que me dedica todos os dias.

A todos os Mestres com quem convivi durante toda a minha vida. Muitos me ensinaram lições que não se aprendem em livros e formaram o meu caráter, moldaram o ser humano que sou hoje.

Com carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

À Universidade Estadual de Campinas na pessoa do Reitor Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa, e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, através do Diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, a oportunidade concedida em estudar nesse centro que é referência para a Odontologia.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa da Coordenadora Prof^a. Dr^a. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia e da secretária Érica A. Pinho Sinhoreti, pela atenção dispensada ao longo de todo o curso de Doutorado.

À Prof^a. Dr^a. Renata de Oliveira Mattos-Graner, por aceitar o desafio de orientar-me e guiar-me em meus primeiros passos em pesquisas laboratoriais. Agradeço a orientação sempre presente, o auxílio constante na elaboração deste trabalho, e a total dedicação ao ensino e à pesquisa, além da paciência em ensinar-me, ainda que repetidas vezes, noções tão básicas. Agradeço a contribuição sem medidas que teve em minha formação profissional e pessoal, e serei eternamente grata por todos os ensinamentos que obtive.

Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling, agradeço a oportunidade de trabalhar nos laboratórios da área de Microbiologia e Imunologia. Agradeço a oportunidade de ter aprendido tanto desse mundo microscópico através do Programa de Estágio Docente (PED).

Aos examinadores que aceitaram compor a banca de tese (em ordem alfabética) Prof^a. Dr^a. Cristiane Yumi Koga-Ito, Prof. Dr. José Francisco Höfling, Prof. Dr.

Rafael Nóbrega Stipp, Prof^a. Dr^a. Renata de Oliveira Mattos-Graner, Prof^a. Dr^a. Ruchele Dias Nogueira.

Aos examinadores que aceitaram compor a banca suplente da tese (em ordem alfabética) Prof^a. Dr^a. Cristiane Duque, Prof^a. Dr^a. Erika Nikitza Shiauha Harth Chu, Prof^a. Dr^a. Maria Regina Lorenzetti Simionato.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia, Prof. Dr. Edgard Graner, Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes, Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas e Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, por todo o conhecimento disponibilizado durante esses três anos de Doutorado, pelo espaço proporcionado nas instalações laboratoriais da área de Patologia do Departamento de Diagnóstico Oral e disposição com que me auxiliaram em diversos momentos deste trabalho.

Aos companheiros da área de Microbiologia e Imunologia, Andressa Monteiro Venturini, Cristiane Duque, Erika Harth Chú, Fabiana Paganotti Roque, Fernando Tadeu Zamunér, Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, Ítalo Sarto Carvalho Rodrigues, Iza Teixeira Alves Peixoto, Janaína de Cássia Orlandi Sardi, Mariana Ferreira Dib João, Maria Paula Maciel Rando Meirelles, Paula Cristina Aníbal, Rafael Nóbrega Stipp, Regianne Umeko Kamiya, Sérgio Eduardo Braga da Cruz, Tarsila Mendes de Camargo, Thaís Rossini de Oliveira, Tiago Taiete, pela convivência diária, ensinamentos compartilhados, e momentos inesquecíveis.

Aos colegas da Pós-Graduação em Estomatopatologia, Adriele Ferreira Gouveia Vasconcellos, Alan Roger dos Santos Silva, Ana Carolina Prado Ribeiro, Ana Lúcia Noronha Francisco, Ana Terezinha Marques Mesquita, Andréia Bufalino, Bruno Augusto Benevenuto de Andrade, Camila Maria Beder Ribeiro, Carolina Cavalcante Bitú, Daniel Berreta Moreira Alves, Débora Campanella Bastos, Fabiana Seguin, Fernanda Gonçalves Basso, Fernanda Viviane Mariano, Jorge

Esquiche Leon, Katya Pulido Diaz, Lays Martin Sobral, Livia Máris Ribeiro Paranaíba, Luiz Alcino Monteiro Gueiros, Manoela Carrera M. Cavalcante Pereira, Marco Antonio Carvalho, Marco Aurélio Carvalho de Andrade, Marianne de Vasconcelos Carvalho, Mário José Romãach Gonzalez Sobrinho, Michelle Agostini, Michelle Gassen Kellermann, Patrícia do Socorro Queiroz Feio, Rebeca de Souza Azevedo, Renato Nicolás Hopp, Rogério de Oliveira Gondak, Rose Mara Ortega, Sibele Nascimento Aquino, Tânia Cristina Benetti Soares, Victor Hugo Toral Rizzo, Wilfredo Alejandro Gonzalez Arriagada, agradeço a receptividade em Piracicaba, a acolhida em meus primeiros momentos na FOP, a convivência nas disciplinas e a maravilhosa troca de conhecimento.

Aos companheiros da pós-graduação de outros departamentos, pela convivência e trocas de experiências nos corredores da FOP.

Aos funcionários desta Faculdade, Wilma C. Ferraz, do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, e aos funcionários Adriano Luis Martins e Eliene Aparecida Orsini Narvaes, do Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, pela disposição com que me auxiliaram e relacionamento desenvolvido ao longo desse tempo.

Aos amigos sempre presentes, Angelinne Ribeiro Ângelo, Amanda Maria Medeiros de Araújo, Ana Paula Vallini Fabrício, Jaime Rissi Passarini Júnior, Kênia Gomes Aires, Kennedy Alexandre Souza Aragão, Maria Amália de Souza, Rita de Cássia Cavalcanti Gonçalves De Biase, Vanda Cendrowicz de Souza, pelos bons momentos e companhia constante, ainda que estivessem distantes, durante minha estada em Piracicaba.

A toda família “Carvalho” e “Moraes”, pela compreensão com a minha ausência em eventos tão importantes que aconteceram durante os anos em que me dediquei ao Doutorado.

Aos meus tios, Albano Soares da Rocha, Armando Rodrigues Coelho Neto, Edma Carvalho de Miranda, Tânia Benites Rodrigues Coelho, e primas, Carolina Carvalho de Miranda, Catarina Carvalho de Miranda, Ana Cristina Carvalho, agradeço as visitas que recebi aqui em Piracicaba e as acolhidas quando estive em Curitiba, Botucatu e São Paulo, simplesmente pela possibilidade de rever familiares, “matar” a saudade de casa e recuperar as energias.

A família do meu noivo que me acolheram maravilhosamente bem e sonharam essa tese juntamente comigo, sempre com a expectativa de minha mudança para o Rio Grande do Sul. Agradeço, especialmente, aos meus maravilhosos cunhados, Camila Pereira Baldin, Cícero de Campos Baldin, Diego de Campos, Fernanda Costa, Fernanda Mezzomo Collares, Paulo Henrique de Campos, e à minha querida sogra, Sandra Maria Baldin.

À Josivalda Silva de Lima, pessoa mais que especial, que me pegou nos braços e está sempre presente em meus momentos mais especiais. Obrigada pelo seu colo em tantos momentos, pelas nossas conversas, por sempre estar disponível pra me ouvir. Agradeço por ter auxiliado à minha mãe em minha criação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos concedidos para a realização desse trabalho, sob número 2008/58333-7 (Bolsa de Doutorado) e 2009/54182-7 (Auxílio Regular à Pesquisa).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado por seis meses.

A todos os amigos que fiz na Faculdade de Odontologia de Piracicaba e na própria cidade de Piracicaba e que, de certa forma, colaboraram, ainda que indiretamente, na realização desse trabalho durante todos esses anos.

Enfim, agradeço a todos que, direta e indiretamente, colaboraram para este trabalho. Estar longe de casa é bastante difícil, e, por vezes, uma palavra amiga é capaz de transformar nosso mundo, nossos pensamentos e nos fazer ver a vida de outra forma.

meus sinceros agradecimentos.

*“Um sonho que se sonha só, é só um
sonho que se sonha só, mas sonho que
se sonha junto é realidade”.*

Raul Seixas

RESUMO

Streptococcus sanguinis são colonizadores primários dos dentes reconhecidos como microrganismos comensais benéficos da cavidade bucal, pois são capazes de inibir o crescimento de espécies patogênicas, como *Streptococcus mutans*. *S. sanguinis* são comumente envolvidos em endocardite bacteriana, embora por mecanismos de patogenicidade ainda não conhecidos. Para colonizar os dentes ou tecidos cardíacos, *S. sanguinis* devem ser capazes de se estabelecer em biofilmes e de se adaptar às diversas condições de estresse ambiental decorridas da ação de microrganismos competidores e/ou das defesas do hospedeiro. A resposta bacteriana a condições de estresse ambiental é regulada por sistemas reguladores globais de transcrição de dois componentes (SDC), os quais são essenciais para modular o transcriptoma bacteriano durante os processos de colonização e infecção do hospedeiro. O genoma de *S. sanguinis* SK36 apresenta 14 desses sistemas. Através de análises de BLAST, identificou-se um SDC com alta similaridade ao sistema VicRK (*vic* de *virulence control*), o qual regula fatores de virulência e é conservado em diversas espécies de bactérias Gram-positivas, como *S. mutans* e *Streptococcus pneumoniae*. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a função do sistema VicRK na biologia de *S. sanguinis*, através da análise dos efeitos da inativação de *vick* em diversas características bacterianas possivelmente associadas à virulência e à formação de biofilmes. Para isto, foi construído um mutante *knock-out* do gene *vick* a partir da cepa SK36, o qual foi designado SKvicK. SKvicK foi comparado à cepa selvagem quanto à capacidade de formação de biofilmes e quanto às características que influenciam na capacidade de colonização (hidrofobicidade, atividade autolítica e sensibilidade ao estresse oxidativo) em diferentes condições atmosféricas. Também foram comparados, entre as cepas, os padrões de expressão de genes com possível função de virulência, cujos ortólogos são regulados por VicRK nas espécies *S. mutans* e/ou *S. pneumoniae*. Estes incluem genes relacionados à formação de biofilmes e biogênese da parede celular (*ssapcsB*, *lysM*, *gtfP*), à

resposta ao estresse oxidativo e produção de peróxido de hidrogênio (*sodA*, *spxB*, *ccpA*). A inativação de *vicK* inibiu claramente a formação inicial de biofilmes. Além disto, SKvicK demonstrou maior sensibilidade ao estresse oxidativo e maior hidrofobicidade celular. A inativação de *vicK* também inibiu, de forma significativa, a transcrição dos genes *pcsB*, *lysM*, *spxB* e *comE*. Estes dados indicam que VicRK regula diversas funções biológicas de *S. sanguinis* importantes para a colonização de humanos.

Palavras-chave: *Streptococcus sanguinis*, Genética de Microrganismos, Biofilmes, Endocardite Bacteriana, Sistema de Dois Componentes, Virulência, Regulação Bacteriana da Expressão Gênica.

ABSTRACT

Streptococcus sanguinis are primary colonizers of the teeth and recognized as beneficial commensal microorganisms of the oral cavity because they are able to inhibit the growth of pathogenic species such as *Streptococcus mutans*. *S. sanguinis* are commonly involved in the infective endocarditis, although pathogenic mechanisms are still unknown. *S. sanguinis* are able to establish in biofilms and to adapt among various environmental stress conditions from competing microorganisms and/or from host defenses during colonization of enamel or endothelial tissues. Bacterial responses from environmental stress conditions are regulated by two-component global regulatory systems (TCS), which are essential to modulate the bacterial transcriptome during colonization and infection of the host. *S. sanguinis* SK36 genome contains at least 14 TCS. Through BLAST analyses, we identified a TCS with high similarity to VicRK system (*vic* from *virulence control*), which regulates virulence factors and is conserved in several species of gram-positive bacteria such as *S. mutans* and *Streptococcus pneumoniae*. The aim of this study was to characterize the role of VicRK system in *S. sanguinis* biology, by analyzing the effects of *vicK* inactivation on several characteristics potentially associated with bacterial virulence and biofilm formation. For this purpose, *vicK* mutant gene knock-out was obtained from strain SK36 and it was designated SKvicK. SKvicK was compared to the wild-type strain about the ability to form biofilms and cellular traits which influence in the ability of host colonization (hydrophobicity, autolytic activity and sensitivity to oxidative stress) under diverse atmospheric conditions. Gene expression was also compared in the strains because these genes are potentially involved in virulence, whose orthologs are regulated by VicRK system in *S. mutans* and *S. pneumoniae* species. These include genes involved in biofilm formation and cell wall biogenesis (*ssapcsB*, *lysM*, *gtfP*), oxidative stress response and production of hydrogen peroxide (*sodA*, *spxB*, *ccpA*). The inactivation of *vicK* inhibited the initial formation of biofilms. Moreover, SKvicK showed increased sensitivity to oxidative stress and cell

hydrophobicity. *vick* gene inactivation also significantly down-regulated transcription of *pcsB*, *lysM*, *spxB* and *comE*. These data indicate that VicRK regulates several biological functions relevant for *S. sanguinis* colonization.

Keywords: *Streptococcus sanguinis*, Microorganisms Genetics, Biofilms, Infective Endocarditis, Two-Component System, Virulence, Bacterial Gene Expression Regulation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ADOTADAS

°C: grau Celsius.

µg: micrograma.

10%CO₂: pressão parcial de dióxido de carbono a 10%.

16SRNA_r: gene codificador do RNA ribossômico 16S.

A_{260nm}: absorbância no comprimento de onda de 260 nanômetros.

A_{280nm}: absorbância no comprimento de onda de 280 nanômetros.

A_{550nm}: absorbância no comprimento de onda de 550 nanômetros.

ATCC: Coleção Americana de tipos de cultura (de *American Type Culture Collection*).

BHA: BHI comercial acrescido de ágar a 1,5% (peso/volume).

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

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.

cDNA: fragmentos de DNA fita simples obtidos a partir da transcrição reversa de moldes de RNA.

CWA: proteínas ancoradas à parede celular (*cell-wall anchored proteins*).

DEPC: reagente *Diethylpyrocarbonate*.

DNA: ácido desoxirribonucléico genômico (de *Deoxyribonucleic Acid*).

dNTP: Trifosfatos de desoxirribonucleotídeos.

eDNA: DNA no meio extracelular.

EDTA: reagente *Ethylenediaminetetraacetic acid*.

ermR: fenótipo resistente à eritromicina.

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

Fase log: fase logarítmica de crescimento bacteriano.

ftf: gene frutossiltransferase.

g: gramas.

gbpB: gene codificador da proteína ligante de glucano B.

GbpB: proteína ligante de glucano B.

gDNA: DNA cromossomal, genômico.

gtfs: genes glicosiltransferases.

Gtfs: proteínas glicosiltransferases.

h: horas.

H₂O₂: peróxido de hidrogênio.

IgA: Imunoglobulina A.

l: Litro.

LB: meio de cultura *Luria-Bertani*.

M: molar.

min: minuto.

ml: mililitro.

mM: milimolar.

MOPS: reagente *Morpholinopropane sulphonic acid*.

n: número.

NaCl: cloreto de sódio.

ORF: fases abertas de leitura (de *Open Reading Frame*).

PA: película adquirida.

pb/bp: pares de base.

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

PcsB: Proteína ortóloga da GbpB de *S. mutans* (de *protein required for cell separation*).

pDNA: DNA plasmidial.

pH: potencial hidrogênico.

qPCR: PCR em tempo real quantitativa.

qRT-PCR: transcrição reversa seguida de PCR quantitativa.

RCF: unidade de força centrífuga relativa (de *Relative Centrifugal Force*)

RNA: ácido ribonucleico (de *Ribonucleic Acid*).

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro.

RT: transcrição reversa que dará origem a cDNA (de *Reverse Transcription*).

RT-PCR quantitativa: o mesmo que qRT-PCR

SDC: sistema regulador de transcrição de dois componentes.

seg: segundo.

TA: temperatura ambiente.

TE: tampão 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0.

THB: caldo *Todd-Hewitt* (de *Todd-Hewitt Broth*).

U: unidade(s).

UV: radiação ultra-violeta.

vick: gene codificador da proteína quinase sensora de superfície VicK (de *Virulence Control Kinase*).

vicR: gene codificador da proteína regulatória VicR (de *Virulence Control Regulator*)

xg: unidade de força centrífuga relativa (RCF).

α: alfa

SUMÁRIO

	Página
1 – Introdução	1
2 – Revisão de Literatura	3
3 – Proposição	21
4 – Material e Métodos	23
5 – Resultados	51
6 – Discussão	81
7 – Conclusão	91
8 – Referências Bibliográficas	93

1. INTRODUÇÃO

Streptococcus sanguinis, previamente referido como *Streptococcus sanguis*, além de ser um habitante normal da cavidade bucal humana, é, classicamente, considerado microrganismo comensal pioneiro do biofilme dental, assim como um antagonista de patógenos bucais, como, por exemplo, *Streptococcus mutans*, principal patógeno da cárie dentária (Ge *et al.*, 2008a). Além disso, *S. sanguinis* também é um dos principais patógenos da endocardite bacteriana.

O início do desenvolvimento do biofilme dental depende da interação específica de proteínas da superfície bacteriana a componentes salivares ou microbianos adsorvidos aos dentes, os quais formam um filme comumente referido como película adquirida (PA). *S. sanguinis* está entre as primeiras espécies que se aderem, especificamente, aos componentes da PA. Esses microrganismos aderidos fornecem novas moléculas de adesão para colonização de outras espécies bacterianas com menor afinidade à PA, seguindo-se uma sucessão ordenada dos inúmeros gêneros bacterianos que compõem o biofilme dental, e, uma vez estabelecida em um local, o biofilme bucal permanece estável ao longo do tempo, apesar das constantes mudanças das condições ambientais (Ahn & Burne, 2007). As razões do alto sucesso na colonização inicial dos dentes por *S. sanguinis* ainda não são totalmente compreendidas, mas parecem ser decorrentes de um conjunto de fatores microbianos, como, por exemplo, a expressão de diversas adesinas de superfícies com alta afinidade aos componentes salivares, o que torna este microrganismo altamente competitivo frente ao grande número de espécies de estreptococos e outros gêneros bacterianos presentes na cavidade bucal.

Diversos fatores de virulência envolvidos na formação de biofilmes têm sido identificados em *S. sanguinis* e outras espécies de estreptococos viridans, grupo ao qual *S. sanguinis* pertence, incluindo adesinas, enzimas que sintetizam a

matriz extracelular de glucanos, e proteínas de interação aos glucanos. Genes envolvidos na síntese e manutenção da parede celular e da competência também têm sido implicados na capacidade de crescimento em biofilmes, sendo incluídos no painel de genes de virulência (Loo *et al.*, 2000; Mattos-Graner *et al.*, 2001; Senadheera *et al.*, 2005). Estes genes de virulência são regulados de forma coordenada por sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (SDC) em resposta a diferentes estímulos ambientais. Entre estes sistemas, destaca-se o sistema VicRK (*vic* de *Virulence control*), o qual parece ser conservado em diversas espécies patogênicas de estreptococos, como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *S. mutans* (Ng *et al.*, 2005; Senadheera *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Winkler & Hoch, 2008).

Assim, será que o sistema vicRK estaria presente e teria função de regulador da expressão de genes de virulência em *S. sanguinis* semelhante ao que ocorre em *S. mutans*? A construção de um mutante *knock-out* para o gene *vicK* poderia contribuir na caracterização do *S. sanguinis*, especificamente trazer novos dados quanto à sua virulência?

Com base nessas questões fundamentais, este estudo procurou caracterizar a função do sistema VicRK na biologia de *S. sanguinis*, através da construção de mutante do gene *vicK* a partir das cepas *S. sanguinis* SK36 e DSS-10, e avaliar diversas características fenotípicas e genéticas, conhecidamente associadas à virulência, através da comparação entre o mutante e a respectiva cepa selvagem.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *STREPTOCOCCUS SANGUINIS* COMO MICRORGANISMO PIONEIRO DO BIOFILME DENTAL E PATÓGENO ENVOLVIDO NA ENDOCARDITE BACTERIANA.

Os biofilmes consistem de comunidades microbianas organizadas em uma matriz extracelular que se formam sobre superfícies bióticas ou abióticas na natureza (Ge *et al.*, 2008a). O biofilme dental consiste de uma comunidade microbiana altamente complexa envolvida por uma matriz de polímeros de origem bacteriana e salivar. O biofilme dental pode causar doenças bucais, dependendo de sua composição microbiana (Filoche *et al.*, 2010; Fröjd *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). Dentre os vários microrganismos presentes no biofilme dental, destaca-se *Streptococcus mutans*, que metaboliza o açúcar da dieta e, assim, produz ácidos que solubilizam as estruturas minerais dos dentes, formando cavitações nos dentes, as lesões de cárie. A placa bacteriana é um biofilme ainda não mineralizado, mas com o passar do tempo e do metabolismo bacteriano, esse biofilme se mineraliza, tornando-se um cálculo dentário (tártaro), ocasionando desde inflamações do tecido gengival (gengivite) até mesmo perda óssea do periodonto (Cavasin Filho & Giovani, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Berezow & Darveau, 2011).

Os estreptococos são importantes membros do biofilme dental, conhecidos por se ligarem às proteínas adsorvidas à superfície dentária, as quais formam um filme denominado película adquirida (PA). A PA é composta por componentes salivares e bacterianos e incluem a alfa-amilase, proteínas ricas em prolina e glicoproteínas. Espécies de estreptococos, como *S. sanguinis* são colonizadores primários dos dentes, pois têm adesinas de alta afinidade à PA. Os colonizadores primários fornecem novas moléculas de adesão permitindo a subsequente colonização por outras bactérias orais com menor afinidade à PA, seguindo-se uma sucessão ordenada dos inúmeros gêneros bacterianos que

compõem o biofilme dental (Gong *et al.*, 2000; Rosan & Lamont, 2000; Hojo *et al.*, 2009; Nobbs *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011a).

A espécie *Streptococcus sanguinis*, previamente referida como *Streptococcus sanguis*, é pertencente a um dos cinco grupos de estreptococos viridans alfa-hemolíticos (grupos mutans, salivarius, anginosus, mitis e sanguinis), ou seja, esses microrganismos produzem um halo verde circunscrevendo as colônias quando cultivados em meio ágar-sangue (Ge *et al.*, 2008a). O grupo sanguinis inclui as espécies *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis* e *Streptococcus gordonii* (Whiley & Beighton, 1998; Facklam, 2002). *S. sanguinis* surge na cavidade bucal humana após a erupção dentária, tornando-se um habitante comensal (normal) da boca, e é, classicamente, considerada uma espécie pioneira do biofilme dental, dessa forma, adere-se e coloniza, seletivamente, os elementos dentários recobertos por saliva (Rosan & Lamont, 2000; Li *et al.*, 2004; Kuramitsu *et al.*, 2007; Hojo *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011).

Estudos clínicos sugerem que uma colonização bucal bem sucedida e uma alta proporção de espécies comensais do gênero *Streptococcus* podem ser benéficas para a saúde bucal. Então, *S. sanguinis* é um antagonista de patógenos bucais como, por exemplo, *Streptococcus mutans*, principal patógeno da cárie dentária. Desta forma, estudos mostram que indivíduos livres de cáries possuem uma alta proporção de *S. sanguinis* associado a níveis quase indetectáveis de *S. mutans*, e o oposto ocorre em indivíduos com cáries (Caufield *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2002; Ge *et al.*, 2008a; Ge *et al.*, 2008b; Zheng *et al.*, 2011a). Além disso, em seres humanos, a colonização inicial com um número abundante de *S. sanguinis* atrasa a adesão do *S. mutans* ao biofilme, sugerindo uma capacidade intrínseca dos colonizadores iniciais dos biofilmes, os quais compreendem cerca de 80% dos estreptococos orais, de promover a homeostase do biofilme (Nyvad & Kilian, 1987; Caufield *et al.*, 2000; Rosan & Lamont, 2000; Aas *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2006).

S. sanguinis está entre as primeiras espécies que se aderem, especificamente, aos componentes da PA, assim como *Streptococcus oralis* e

Actinomyces naeslundii (Kolenbrander *et al.*, 2010). Estes microrganismos aderidos fornecem novas moléculas de adesão para a colonização de outras espécies bacterianas com menor afinidade à PA, seguindo-se uma sucessão ordenada dos inúmeros gêneros bacterianos que compõem o biofilme dental, formando um biofilme multiespécies e, uma vez estabelecido em um local, o biofilme dental sofre maturação ao longo do tempo, apesar das constantes mudanças das condições ambientais (Ahn & Burne, 2007; Fröjd *et al.*, 2011). Tornou-se evidente que a colonização descrita anteriormente aumenta a habilidade de o microrganismo sobreviver em ambientes sob condições estressantes, assim como em presença de agentes antimicrobianos (Marsh, 2003).

As razões pela alta capacidade de colonização inicial dos dentes por *S. sanguinis* ainda não é totalmente compreendida, mas parece ser decorrente de um conjunto de fatores microbianos que tornam estes microrganismos altamente competitivos frente ao grande número de espécies de estreptococos e outros gêneros bacterianos presentes na cavidade bucal. Entre estes fatores, *S. sanguinis* produz IgA1-proteases, o que permite o escape da ação de anticorpos IgA salivares. *S. sanguinis* também expressa diversas adesinas de superfície com alta afinidade a componentes salivares (α -amilases e proteínas ricas em prolina) e microbianos da PA. O estabelecimento destes microrganismos no biofilme dentário envolve também a síntese de uma matriz extracelular de glucanos, através da expressão de glicosiltransferases (Gtfs). Além disto, estes microrganismos parecem capazes de interagir com glucanos insolúveis produzidos pela espécie patogênica *S. mutans* (Hamada *et al.*, 1981). Análises recentes indicam que o genoma da cepa *S. sanguinis* SK36 contém genes que codificam proteínas de superfície ligadoras de glucano, as quais podem participar na interação do *S. sanguinis* com a matriz extracelular do biofilme.

Apesar da benéfica associação à microbiota dentária comensal e de não se ter conhecimento sobre o seu papel direto em doenças orais, *S. sanguinis* consiste em uma das principais espécies de estreptococos viridans associada à

bacteremia e endocardite bacteriana (Douglas *et al.*, 1993; Mylonakis & Calderwood, 2001; Paik *et al.*, 2005; Tleyjeh *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2008a).

A endocardite bacteriana é uma infecção das válvulas do coração ou do endocárdio que se desenvolve quando bactérias são transferidas para a corrente sanguínea e se aderem às áreas de lesão das válvulas coronárias, e essas lesões podem ser provocadas por diferentes fatores como doenças coronárias congênitas, febre reumática ou prolapso da válvula mitral (Parsek & Singh, 2003; Ge *et al.*, 2008a). Nem sempre fatores predisponentes de lesões nas válvulas cardíacas são identificados, o que dificulta a prevenção desta patologia (Wilson *et al.*, 2007).

Na endocardite bacteriana, a infecção primária de uma lesão de válvula cardíaca nativa envolve mecanismos complexos de formação de um biofilme microbiano, comumente referido como “vegetação”, no qual bactérias se ligam a uma rede de fibrina, plaquetas e outros componentes do hospedeiro nas válvulas afetadas, multiplicam-se e se acumulam através da produção de uma matriz extracelular. Este biofilme promove alteração da função valvular e funciona como uma fonte de constante liberação de microrganismos na corrente sangüínea, mesmo que sob antibioticoterapia. Além disto, partes do biofilme liberadas na corrente sangüínea podem causar embolia em áreas mais periféricas da circulação, podendo afetar órgãos distantes como os rins, cérebro e extremidades.

O papel do cirurgião-dentista consiste em prevenir a endocardite bacteriana em pacientes que possuem os fatores predisponentes anteriormente citados e quando existe a necessidade de tratamento odontológico invasivo, como, por exemplo, em casos de exodontias. Essa prevenção ocorre através de uma antibioticoprofilaxia, administrando-se, antibióticos previamente ao tratamento odontológico em questão, e, muitas vezes, fazendo-se uso de uma cobertura antibiótica posterior ao tratamento odontológico.

O controle da endocardite bacteriana é muito difícil, porque os microrganismos do biofilme sobre as áreas lesionadas são altamente resistentes a antibióticos e, por este motivo, a endocardite causa morbidade e mortalidade

substanciais (Parsek & Singh, 2003; Ge *et al.*, 2008a). Estudos retrospectivos reportaram taxas de mortalidade entre 12 a 46% dos pacientes com endocardite bacteriana (Bayer *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 2007). A resistência dos microrganismos que promovem a endocardite não parece ser decorrente da baixa penetração dos antibióticos no biofilme valvular. Estudos com antibióticos marcados radioativamente indicam que os antibióticos podem atingir concentrações até 200 vezes maior no biofilme valvular do que as concentrações atingidas na corrente sangüínea, indicando que a maior resistência a antibióticos está relacionada a alterações na fisiologia bacteriana através de mecanismos que precisam ser investigados (Parsek & Singh, 2003).

Academicamente, a formação de biofilmes bacterianos pode ser dividida em quatro fases: 1) fase de aderência a uma superfície inerte ou biológica, 2) fase de proliferação microbiana e acúmulo mediado pela produção de uma matriz extracelular, 3) uma fase de maturação onde as células apresentam uma fisiologia de alta resistência a diferentes tipos de estresse ambiental, 4) fase na qual sub-comunidades do biofilme se destacam e são liberados para os fluídos que banham o biofilme formado. Os mecanismos moleculares envolvidos em cada uma destas fases são complexos e parecem ser regulados em resposta a estímulos ambientais e bacterianos.

Diversos fatores de virulência envolvidos na formação de biofilmes têm sido identificados em *S. sanguinis* e outras espécies de estreptococos viridans, incluindo adesinas, enzimas que sintetizam a matriz extracelular de glucanos, proteínas de interação aos glucanos. Genes envolvidos na síntese e manutenção de parede celular (*pbem* de *S. gordonii* e *gbpB* em *S. mutans*) e competência (*comC*, *comD*, *comE*) também têm sido implicados na capacidade de crescimento em biofilmes, sendo incluídos no painel de genes de virulência (Loo *et al.*, 2000; Mattos-Graner *et al.*, 2001; Senadheera *et al.*, 2005). Estes genes de virulência são regulados de forma coordenada por sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (SDC) em resposta a diferentes estímulos ambientais. Entre estes sistemas, destaca-se o sistema VicRK (*vic* de *Virulence control*), o qual

parece ser conservado em diversas espécies patogênicas de estreptococos, como *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *S. mutans* (Ng *et al.*, 2005; Senadheera *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Winkler & Hoch, 2008).

Porém, em estudo de Presterl *et al.* (2005), não foi observada relação entre a formação de biofilme *in vitro* e a endocardite bacteriana, visto que a maior parte de estreptococos do grupo viridans isolados de pacientes com endocardite ou com infecções sanguíneas neutropênicas não formaram biofilmes *in vitro* (10 dentre 18 espécies de *S. sanguinis* e 16 dentre 22 espécies de *S. gordonii*). Além disso, três cepas de *S. gordonii* com mutações em *comD*, *fruK* ou *pbp2b* não formaram biofilmes em placas tratadas com fibronectina utilizando meio de cultura CDEN plus (meio quimicamente definido adaptado por Garcia-Bustos *et al.*, 1987, em que diminuiu a concentração de lisina para 10µg/ml do meio original criado por Alexander Tomasz, em 1964) com 0,015% de extrato de levedura, além de não se mostrarem atenuados para a virulência em endocardite (Bizzini *et al.*, 2006). Por outro lado, a endocardite bacteriana envolve o crescimento de micro-colônias de bactérias envoltas por uma matriz extracelular conferindo, portanto, propriedades de biofilme infeccioso (Parsek & Singh, 2003).

De forma diferente, o estudo de Mohamed *et al.* (2004) conclui que a formação do biofilme tem sido associada à endocardite, pois demonstrou que isolados de *Enterococcus faecalis* de pacientes com endocardite produziram, de forma significativa, mais biofilme que isolados não provenientes de endocardite. Em *E. faecalis*, uma mutação no gene *ebp* produziu um biofilme defeituoso, ou seja, uma redução significativa na formação do biofilme, e, dessa forma, atenuou significativamente a virulência desse microrganismo em um modelo de endocardite (Nallapareddy *et al.*, 2006). A influência dos mecanismos de formação de biofilmes na patogenia das endocardites bacterianas precisa ser melhor estudada.

2.2. FUNÇÃO DO SISTEMA DE DOIS COMPONENTES VicRK NA BIOLOGIA DE ESPÉCIES PATOGÊNICAS DO GÊNERO *STREPTOCOCCUS*.

Os SDCs constituem um importante mecanismo regulatório possuindo papel fundamental na adaptação de bactérias às condições ambientais presentes em seus nichos ecológicos (Gryllos *et al.*, 2008). Um SDC típico consiste de uma proteína de membrana (normalmente um histidina quinase, K), a qual se autofosforila quando ativada por sinais ambientais, transferindo então o grupo fosfato a uma proteína regulatória intracelular denominada regulador de resposta (R) (Winkler & Hoch, 2008). Esta última muda então sua conformação e interage com sequências regulatórias de diversos genes, ativando e/ou inibindo a transcrição. Diversos destes sistemas também incluem proteínas acessórias, cujas funções não são totalmente compreendidas.

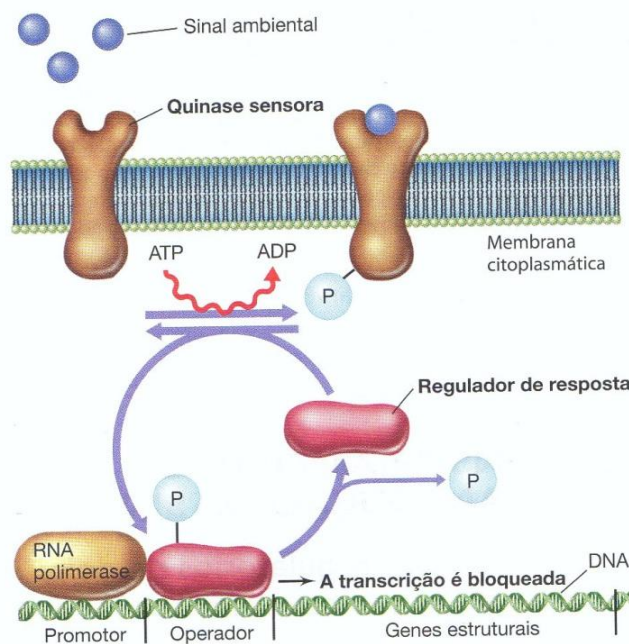


Figura 1 – Controle da expressão gênica por um sistema de dois componentes. Um SDC típico consiste de um receptor de membrana histidina quinase sensora, localizada na membrana celular (geralmente designado pela letra K ou S, ex. *VicK*) e um regulador de resposta intracelular (geralmente designado pela letra R, ex. *VicR*). Em resposta a um ou mais estímulos ambientais específicos, o sensor K sofre auto-fosforilação e transfere o grupo fosfato ao outro componente principal, o R cognato. O R fosforilado adquire uma nova conformação para se ligar às seqüências regulatórias (operadoras) de genes alvos (regulon), ativando ou inibindo sua transcrição. A atividade da fosfatase do regulador de resposta libera lentamente o fosfato do regulador de resposta, fechando o circuito. Esse esquema básico é adaptável e variável de acordo com sistemas específicos. FONTE: Madigan *et al.*, 2010.

Em bactérias patogênicas, os SDCs regulam de forma coordenada diversos mecanismos fisiológicos, através dos quais os patógenos enfrentam as diversas condições de estresse com as quais se deparam durante os processos infecciosos. Por esta razão, os SDCs têm sido reconhecidos como alvos importantes para o desenvolvimento de quimioterápicos, uma vez que diversos fatores de virulência poderiam ser bloqueados de forma conjunta. Dentre os diversos SDCs, o sistema *VicRK* (*Vic* de *Virulence control*) tem recebido atenção em estudos recentes sobre mecanismos de virulência de diversos patógenos

gram-positivos, incluindo-se espécies do gênero *Streptococcus* (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. mutans*), *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *Lactobacillus spp.*, e *Listeria ssp.* Em *Bacillus subtilis*, *Enterococcus* e *Staphylococcus spp.*, o sistema VicRK é denominado sistema YycFG. Os sistemas Vic têm sido relacionados à regulação direta ou indireta de diversos processos fisiológicos incluindo-se a biossíntese de peptidoglicano, divisão celular, integridade de membrana, síntese de polissacarídeos extracelulares, fatores associados direta ou indiretamente à capacidade de formação de biofilmes (Winkler & Hoch, 2008).

Em *S. pneumoniae* (cepa R6), o sistema VicRK regula a proteína de superfície PcsB (Ng *et al.*, 2005), cujo ortólogo em *S. mutans* (denominado GbpB, de *glucan-binding protein*) tem sido alvo de estudos do nosso grupo nos últimos anos. Outras proteínas de superfície de *S. pneumoniae* foram identificadas como parte do regulon de VicRK, incluindo-se o antígeno de superfície PspA, implicado na virulência por interferir na ativação do sistema complemento, e as proteínas de superfície Spr0096 (*LysM domain protein*), Spr1875 e Spr0709, cujas funções não estão elucidadas. Em *S. pneumoniae*, o sistema Vic parece também estar envolvido na manutenção da integridade de membrana (Ng *et al.*, 2005). Nesta mesma espécie, o SDC VicRK influencia na formação da cápsula polissacarídica por um processo ainda não compreendido, associado à regulação do gene que codifica PcsB (*pcsB*) (Winkler & Hoch, 2008).

Em *S. mutans*, o sistema VicRK regula de forma direta a transcrição dos genes *gtfB* e *gtfC*, os quais codificam, respectivamente, as glicosiltransferases B (GtfB) e C (GtfC), que sintetizam a matriz extracelular de glucanos a partir da sacarose. O sistema VicRK também regula o processo de competência por processos ainda não totalmente compreendidos (Senadheera *et al.*, 2005). Assim como em *S. pneumoniae*, em *S. mutans*, VicRK parece regular genes envolvidos na biossíntese e/ou manutenção da parede celular, incluindo-se *gbpB* (Senadheera *et al.*, 2005; Mattos-Graner, 2008) e proteínas de superfície envolvidas na biossíntese de parede celular [SMu0629 – *sod* (*putative manganese-type superoxide dismutase, Fe/Mn-SOD*)] (Ahn & Burne, 2007).

Em *Streptococcus agalactiae*, a inativação de *vick* promoveu redução na expressão de PcsB e afetou diversas características como o crescimento em soro e a virulência em modelos animais, além de promover redução na expressão de proteínas de sistemas de transporte de açúcar (Spy1060) (Liu *et al.*, 2006).

2.3. FATORES DE VIRULÊNCIA DE *S. SANGUINIS* POSSIVELMENTE REGULADOS PELO SISTEMA VicRK.

Neste estudo, consideraram-se os seguintes fatores de virulência: 1) adesinas e proteínas de superfície; 2) produção de matriz extracelular e proteínas ligadoras de glucano; 3) resistência ao estresse oxidativo, produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e competência. Estes fatores estão relacionados ao estabelecimento de *S. sanguinis* no biofilme dentário e, possivelmente, participam da patogenia da endocardite bacteriana.

2.3.1. ADESINAS E PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE

S. sanguinis é uma das espécies do grupo viridans cujo genoma contém o número mais extenso de genes que codificam adesinas ou proteínas de superfície (Xu *et al.*, 2007). Diversos genes identificados no genoma de *S. sanguinis* codificam homólogos de adesinas identificadas em espécies patogênicas de estreptococos, embora a maioria destas proteínas e seus respectivos ligantes ainda sejam desconhecidos. Um total de 33 proteínas ancoradas à parede celular (CWA, de *cell-wall anchored proteins*), hipotéticas ou conhecidas, foram identificadas no genoma de *S. sanguinis*, número muito superior ao detectado em outras espécies relacionadas, como *S. mutans* (3 CWAs) e *S. pneumoniae* R6 (13 CWAs). Algumas das CWA de *S. sanguinis* parecem compartilhar funções como, por exemplo, a ligação ao colágeno (Xu *et al.*, 2007).

Sugere-se que o grande número de proteínas de superfície explique a alta capacidade de adesão de *S. sanguinis* à PA e a outras espécies e gêneros bacterianos do biofilme dentário, assim como a sua capacidade de aderir-se aos componentes do hospedeiro em lesões de válvulas cardíacas. Em *S. mutans* e *S. pneumoniae*, o regulon de VicRK inclui diversas proteínas de superfície, algumas envolvidas na síntese de parede celular (Ng *et al.*, 2004), no processamento de proteínas de superfície e na estrutura de biofilmes (Senadheera *et al.*, 2005; Ahn & Burne, 2007).

Através de análises de BLAST, pesquisou-se a presença de genes do regulon VicRK de *S. pneumoniae* R6 no genoma de *S. sanguinis*. Através desta análise, identificaram-se duas proteínas em *S. sanguinis*, SSA_0094 (*cell wall metabolism; LysM type protein*) e SSA_1543 (proteína de membrana conservada; PMc), altamente similares (60 e 64% de similaridade) a proteínas de superfície diretamente reguladas por VicRK em *S. pneumoniae* (respectivamente Spr1875 e Spr0709). Além disto, identificamos em *S. sanguinis*, um homólogo da proteína GbpB de *S. mutans*, também expresso em *S. pneumoniae* (PcsB), ambos regulados pelo sistema VicRK nestas duas últimas espécies (Ng *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 2005; Senadheera *et al.*, 2005). Este homólogo apresenta 69% de similaridade à GbpB de *S. mutans*. Nesta tese, denominamos o respectivo gene de *S. sanguinis* de *ssapcsB*.

2.3.2 PRODUÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR E PROTEÍNAS LIGADORAS DE GLUCANO.

Muitas espécies bacterianas sintetizam polímeros de glucano e proteínas ligadoras de glucano, e essa função é importante para a capacidade de adesão ao biofilme dentário (Hamada *et al.*, 1981; Banas & Vickerman, 2003).

As glicosiltransferases são as enzimas que catalisam a síntese de glucanos, assim como são capazes de hidrolisarem glucanos, incluindo amido e

celulose, os quais podem atuar como substratos para o crescimento microbiano (Warren, 1996).

Para muitos estreptococos orais, os glucanos compreendem uma fina camada extracelular produzida na presença de sacarose, e as proteínas ligadoras de glucano são importantes promovem a adesão e a formação do biofilme dental (Gibbons & van Houte, 1973).

Dessa forma, assim como a espécie *S. mutans*, *S. sanguinis* é capaz de sintetizar glucanos a partir da expressão da enzima glicosiltransferase (Gtf), cujo substrato é a sacarose. E no caso da formação do biofilme na endocardite bacteriana, exopolissacarídeos associados à superfície de *S. sanguinis* e *S. mutans* parecem atuar como adesinas ligando-se a válvulas cardíacas lesadas (Scheld *et al.*, 1978).

O genoma de *S. sanguinis* SK36 contém pelo menos um gene que codifica Gtf capaz de sintetizar glucanos (*gtfP*) (Xu *et al.*, 2007). Em *S. mutans*, o sistema VicRK regula a expressão dos genes *gtfB* e *gtfC* na cepa UA159 e em diversos isolados clínicos (Mattos-Graner, 2008). A interação direta de VicR com sequências reguladoras consenso em *gtfB*, *gtfC* e *ftf* (frutosiltransferase) foram demonstradas em *S. mutans* (Senadheera *et al.*, 2005), embora o mecanismo de regulação de *gbpB* ainda não esteja totalmente elucidado. Em estudo de Mattos-Graner *et al.* (2001), verificou-se que a inativação de *vicK* promove uma redução de cerca de 10 vezes na produção de GbpB associada à superfície celular ou secretada, em diversas cepas *S. mutans*. Esta redução foi restaurada quando os mutantes foram complementados com plasmídeos contendo o gene *vicK* funcional.

O papel do gene *gtfP* de *S. sanguinis* SK36 na virulência é ainda pouco compreendido e não há informação sobre os mecanismos reguladores. Através de pesquisas com a sequência a montante da fase aberta de leitura (ORF) de *gtfP*, não se verificou sequência consenso característica de interação com *vicR*. Entretanto, esta sequência também não foi identificada em *gbpB* de *S. mutans*, a despeito das evidências de que mutantes *vicK* demonstram redução significativa

dos níveis de transcritos de *gbpB* em UA159 e em diversas cepas *S. mutans* (Senadheera *et al.*, 2005; Mattos-Graner *et al.*, 2001). Diferentemente, em *S. pneumoniae*, uma sequência consenso característica de *vicR* foi identificada a montante do ortólogo de *gbpB* (*pcsB*) (Ng *et al.*, 2005). Ainda não se sabe se *vicR* apresenta mais de uma sequência consenso de interação ou se estas seqüências regulatórias são variáveis entre espécies. Portanto, deve-se investigar se *gtfP* e *gbpB* são regulados pelo SDC VicRK em *S. sanguinis*.

2.3.3 RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO, PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂) E COMPETÊNCIA.

O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) é produzido por muitos membros do gênero *Streptococcus* (García-Mendoza *et al.*, 1993; Kreth *et al.*, 2005a; Ramos-Montañez *et al.*, 2008) e é importante em três aspectos.

Primeiro, relata-se a produção de H₂O₂ como fator de virulência para as espécies *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*, só que, nessa última espécie, o H₂O₂ produzido causa dano direto ao tecido do hospedeiro (Weiser *et al.*, 1994; Ginsburg & Sadovnic, 1998; Auzat *et al.*, 1999; Ramos-Montañez *et al.*, 2008).

Segundo, a produção de H₂O₂ é relacionada à competição e coexistência em comunidades microbianas como os biofilmes orais, isto é, espécies de estreptococos podem produzir substâncias inibitórias, como o H₂O₂, com a finalidade de reduzir o crescimento de microrganismos co-residentes (Chen *et al.*, 2011). Um dos principais mecanismos de antagonismo ocorre por parte das espécies *S. sanguinis* e *S. gordonii* contra espécies patogênicas dos biofilmes dentários, como, por exemplo, *S. mutans* e *Porphyromonas gingivalis*, e consiste na produção de H₂O₂ (Ryan & Kleinberg, 1995; Kreth *et al.*, 2005a; Kreth *et al.*, 2008). *S. sanguinis* também pode inibir o crescimento de *S. aureus* através do mesmo mecanismo (Uehara *et al.*, 2006).

Outros estudos também investigaram a capacidade inibitória do H₂O₂ quando produzido por outras espécies de estreptococos orais (García-Mendoza *et*

al., 1993; Kreth *et al.*, 2005a; Kreth *et al.*, 2008). Entretanto, pressões ambientais que ameacem a sobrevivência de *S. sanguinis* e/ou a interação com outros microrganismos parecem influenciar no fenótipo de produção de H_2O_2 (Kreth *et al.*, 2005a). Alguns estudos *in vitro* demonstraram que H_2O_2 é o único agente produzido por *S. sanguinis* que possui a capacidade de inibir o crescimento de *S. mutans* (Kreth *et al.*, 2005a; Kreth *et al.*, 2008).

Terceiro, H_2O_2 é um produto do metabolismo aeróbico (Jakubovics *et al.*, 2002). De uma forma geral, H_2O_2 é produzido pela enzima piruvato-oxidase (SpxB) através de uma reação de conversão do piruvato em acetil-fosfato, e essa reação requer a presença de oxigênio, gerando H_2O_2 e CO_2 (gás carbônico) durante o processo catalítico. H_2O_2 se difunde para fora da célula bacteriana, exercendo seu efeito antimicrobiano nas espécies vizinhas susceptíveis a H_2O_2 (Weiser *et al.*, 1994; Auzat *et al.*, 1999; Tittmann *et al.*, 2005; Ramos-Montañez *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2011a). Assim, existem reais evidências de que o crescimento em aerobiose estimula a produção de H_2O_2 em *S. sanguinis*.

Estudos demonstraram que o gene codificador da piruvato-oxidase (*spxB*) está sob o controle transcricional da proteína A de controle catabólico (CcpA), sendo essa o principal regulador transcricional do ciclo de repressão catabólica do carbono em bactérias gram-positivas (Warner & Lolkema, 2003; Zheng *et al.*, 2011b).

Um importante fator ambiental que influencia positivamente a competitividade de *S. sanguinis* frente a *S. mutans* é o oxigênio, porque sob condições anaeróbicas *S. sanguinis* não consegue inibir o crescimento de *S. mutans* quando em ensaios de antagonismo *in vitro* (Kreth *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2011a).

A transformação genética é uma habilidade natural de espécies competentes para captar DNA do meio extracelular (eDNA). Em aerobiose, *S. sanguinis* libera DNA genômico para o meio extracelular, o que pode estar associado com a formação de biofilmes, assim como essa espécie é competente, conseguindo captar o eDNA (Steinmoen *et al.*, 2002; Moscoso & Claverys, 2004).

Existem diversas indicações de que a competência está envolvida em processos de virulência, e embora a dinâmica da relação entre a capacidade de captar DNA exógeno e a virulência não seja compreendida, sugere-se que a captação de DNA exógeno amplie a aquisição de genes importantes para a sobrevivência sob condições ambientais adversas (Loo *et al.*, 2000; Senadheera *et al.*, 2005).

Reconhece-se, atualmente, que o eDNA estabiliza a aderência célula-célula e a arquitetura do biofilme, e em diversas espécies como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, o eDNA contribui para a formação do biofilme atuando como um componente da matriz extracelular (Allesen-Holm *et al.*, 2006; Bayles *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2007; Rice *et al.*, 2007; Rice & Bayles, 2008; Thomas *et al.*, 2008). Então, espécies comensais orais, como *S. sanguinis* e *S. gordonii*, liberam eDNA em processos utilizando a enzima piruvato-oxidase (SpxB) quando em contato com o substrato H₂O₂ em ensaios com controle do oxigênio ambiental, o que aparentemente dá suporte à formação do biofilme dental e facilita a troca de material genético entre cepas competentes (Kreth *et al.*, 2008; Kreth *et al.*, 2009).

O sistema VicRK é reconhecido como um sistema envolvido na resposta ao estresse oxidativo em diversas espécies. Uma das hipóteses é que o sistema VicRK de *S. sanguinis* regule funções biológicas ativadas por variações na exposição ao oxigênio, como o fenótipo de competência e a produção de H₂O₂, pois mutantes VicRK em *S. mutans* e *S. pneumoniae* demonstraram significativa redução na competência, quando comparados com as cepas selvagens (Senadheera *et al.*, 2005; Mattos-Graner, 2008; Winkler & Hoch, 2008).

2.4. IDENTIFICAÇÃO DE GENES QUE POSSIVELMENTE COMPÕEM O REGULON DE VicRK EM *S. SANGUINIS*.

Genes que compõem o regulon do sistema VicRK em outras espécies de estreptococos foram identificados através de análises de BLAST no genoma de

S. sanguinis SK36 (Tabela 3). Esses genes estão associados ao mecanismo de colonização, de formação de biofilmes e de competição com outras espécies microbianas da cavidade bucal. Dessa forma, genes como *ssapcsB* (ortólogo do gene *gbpB* em *S. mutans* e do *pcsB* em *S. pneumoniae*) e *lysM* (proteína de superfície celular), possivelmente, estão envolvidos na biogênese da parede celular e na formação de biofilmes em *S. sanguinis*, visto que os ortólogos dos mesmos possuem essas funções em *S. mutans* (Duque *et al.*, 2011; Stipp, 2010) e em *S. pneumoniae* (Ng *et al.*, 2005). O gene *gtfP* é similar aos genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* de *S. mutans*, os quais codificam as enzimas glicosiltransferases *B*, *C* e *D* (GtfB, GtfC e GtfD), que são responsáveis pela produção de glucanos, principal componente da matriz extracelular dos biofilmes. Os genes *spxB* e *ccpA* estão relacionados com a competitividade de *S. sanguinis* com outros colonizadores bucais, como *S. mutans* e *Porphyromonas gingivalis*, visto que participam da produção de H₂O₂. A piruvato-oxidase catalisa a formação do acetil-fosfato a partir do piruvato, e esse processo produz CO₂ e H₂O₂. O gene *ccpA* codifica a proteína A de controle catabólito (CcpA), a qual é um regulador negativo de *spxB* (Zheng *et al.*, 2011b).

Os genes *cwdP* (*ssa0304* – “cell wall degradation protein”) e *pmC* (*ssa1543* – “proteína de membrana conservada”) são genes que ainda não foram bem estudados, mas são conservados em espécies bucais como *S. mutans* e *S. gordonii*, e, possivelmente, *cwdP* funciona como hidrolase de peptideoglicano (Stipp, 2010). Além disso, *cwdP* codifica uma proteína de 221 aminoácidos que possui 47% de similaridade com a proteína SMu.367 com 211aa de *S. mutans*, a qual é anotada no genoma de *S. mutans* como uma hidrolase de parede celular e contém domínios semelhantes à GbpB. A proteína PMc é uma proteína regulada em *S. pneumoniae* pelo sistema VicRK (Ng *et al.*, 2005). Então, CwdP e PMc podem desempenhar funções para manutenção da integridade do envelope celular em *S. sanguinis*.

O gene *sodA* codifica a enzima superóxido-dismutase, a qual catalisa uma reação de óxido-redução a partir do ânion superóxido produzindo oxigênio e

peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dessa forma, caracteriza-se como uma importante defesa anti-oxidante para células expostas ao oxigênio. A proteína codificada por *sodA* apresenta similaridade (81%) à proteína codificada por SMu.629, anotada como uma enzima superóxido dismutase dependente de manganês. Esta enzima parece participar da adaptação de *S. mutans* ao estresse oxidativo (Ahn & Burne, 2007). Mutantes *knock-out* de SMu.629 apresentaram redução do crescimento e capacidade alterada de formar biofilme em aerobiose, sugerindo importância para o crescimento de *S. mutans* em ambientes oxidativos (Ahn & Burne, 2007).

O gene *comE* participa do sistema de dois componentes *ComCDE*, o qual é um sistema de *quorum-sensing* que regula a competência, isto é, a capacidade que o microrganismo de captar DNA do meio extracelular e incorporá-lo ao seu genoma.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar o papel do sistema de dois componentes VicRK na biologia de *Streptococcus sanguinis*. Para isto, os objetivos específicos foram:

3.1 Identificar o sistema de dois componentes VicRK no genoma de *Streptococcus sanguinis* SK36.

3.2 Identificar o gene *vick* (proteína sensora histidina quinase) no sistema de dois componentes VicRK de *Streptococcus sanguinis* SK36.

3.3 Construir um mutante *knock-out* do gene *vick* a partir da cepa *Streptococcus sanguinis* SK36.

3.4 Analisar o efeito da inativação de *vick* na morfologia celular, no crescimento planctônico e em biofilmes, na sensibilidade ao estresse oxidativo, na resistência à autólise e na hidrofobicidade celular, sob diferentes condições atmosféricas.

3.5 Analisar o efeito da inativação de *vick* na expressão de genes relacionados à formação de biofilmes e biogênese do envelope celular (*ssapcsB*, *lysM*, *cwdP*, *pmC*, *gtfP*), resposta ao estresse oxidativo e produção de peróxido de hidrogênio (*sodA*, *spxB*, *ccpA*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO DO SISTEMA DE DOIS COMPONENTES VicRK NO GENOMA DE *S. SANGUINIS*.

A análise do genoma da cepa *Streptococcus sanguinis* SK36 foi concluída recentemente (Xu *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2008a). A cepa *S. sanguinis* SK36, originalmente isolada do biofilme dental, é naturalmente competente e apresenta diversas características típicas da espécie, dentre as quais se destaca adesão a componentes salivares adsorvidos à hidroxiapatita e virulência em modelos de endocardite bacteriana (Xu *et al.*, 2007).

O genoma de *S. sanguinis* é composto por um cromossomo circular de 2.388.435pb (7 a 25% maior do que o de diversas outras espécies de estreptococos, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*) e apresenta a maior proporção de C+G em comparação com as espécies anteriormente citadas. Seu genoma parece codificar um total de 2.274 proteínas, sendo que 1.353 genes são compartilhados entre *S. sanguinis*, *S. mutans* e *S. pneumoniae*. Outros 170 genes são compartilhados apenas com *S. pneumoniae*, enquanto que 19 são compartilhados apenas com *S. mutans* (Xu *et al.*, 2007).

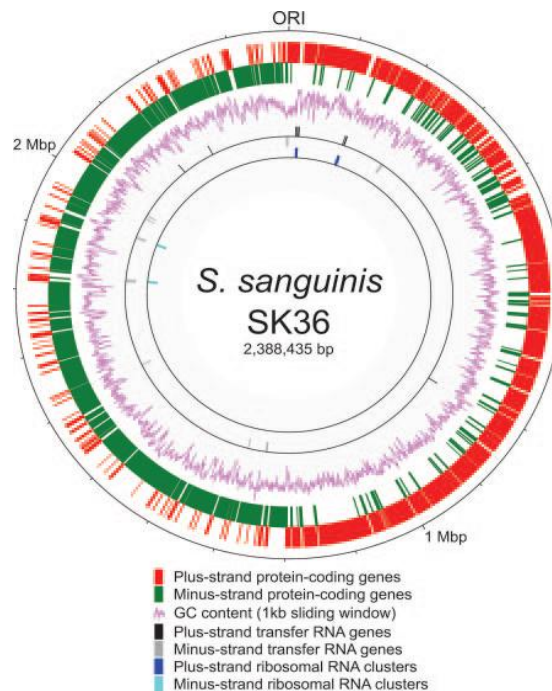


Figura 2 – Mapa do DNA genômico circular do *S. sanguinis* SK36. FONTE: Xu *et al.*, 2007.

Um total de 14 SDCs foram identificados em *S. sanguinis* SK36, e Patel *et al.* (2010) buscou caracterizá-los através do *knock-out* dos respectivos genes codificadores das proteínas regulatórias de cada um dos SDCs, porém, descobriu-se que o gene codificador da proteína regulatória do sistema VicRK, o gene *vicR* (SSA_1565), é essencial, impossibilitando, assim, o seu estudo.

Utilizando-se o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) do site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) foi possível obter as sequências das proteínas que compõem o sistema VicRK em *S. mutans* e, por análise comparativa dos genomas de *S. sanguinis* e *S. mutans*, procurou-se identificar proteínas que possuísem alta similaridade no genoma de *S. sanguinis* SK36.

4.2. CEPAS E PLASMÍDEO SELECIONADOS PARA O ESTUDO E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO DE ROTINA.

A cepa *S. sanguinis* SK36, cujo genoma foi sequenciado (Xu *et al.*, 2007) e a cepa *S. sanguinis* DSS-10 foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) e utilizadas nesta tese. A cepa *S. sanguinis* DSS-10, que é sensível à eritromicina, foi incluída em alguns ensaios como mais uma cepa da espécie *S. sanguinis*. DSS-10 foi isolada de paciente com endocardite bacteriana subaguda. A cepa SK36 foi isolada de biofilme dental (Gong & Herzberg, 1997) e seu genoma é conhecido (Xu *et al.*, 2007). As cepas *S. mutans* UA159 e respectiva mutante *knock-out* de *vick*, designada UAvick, também foram utilizadas como controle de diversos ensaios fenotípicos, uma vez que estas cepas foram caracterizadas em estudos prévios (Stipp, 2010; Duque *et al.*, 2011). O plasmídeo pVA838 (gentilmente cedido por Dr^a. Margaret Duncan, *The Forsyth Institute*, Boston, MA, EUA) foi utilizado para obtenção do gene de resistência à eritromicina, utilizando-se a cepa *Escherichia coli* DH5 α para a propagação dos mesmos.

As cepas *S. sanguinis* selvagens (*wild-type*; WT) foram cultivadas a partir de estoques congelados a -20°C, em meio *skim milk* (Difco Labs, EUA), dos quais foram removidos 10 μ l de suspensão e estriados em agar *Brain Heart Infusion* (BHA) (Difco Labs, EUA) e incubados a 37°C, sob atmosfera de 10%CO₂ (Water-Jacked CO₂ Incubators/Cole Parmer Instruments, EUA; microaerofilia) durante 24h. Após o crescimento, cinco colônias isoladas foram inoculadas em 5ml de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco Labs, EUA), e incubadas por 18h sob as mesmas condições anteriormente citadas e utilizadas como inóculo *starter*, ou seja, inóculo inicial proveniente de culturas bacterianas *overnight* e que possuam absorbâncias semelhantes. As leituras de absorbância foram realizadas com comprimento de onda de 550 nanômetros (A_{550nm}) em espectrofotômetro *Genesys 2* (Spectronic Unicam, EUA), objetivando a quantificação das células

provenientes do crescimento *overnight* para se utilizar cepas com absorbâncias semelhantes.

A cepa de *E. coli* DH5 α foi cultivada em Luria Bertani (LB caldo ou agar) (Difco Labs, EUA), acrescido de 100 μ g/ml de eritromicina (Sigma-Aldrich[®], EUA) quando necessário, durante 18 horas ou menos, à 37°C, em aerobiose com ou sem agitação.

4.3. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO (gDNA) E DNA PLASMIDIAL (pDNA).

Para a construção dos mutantes, os DNAs genômicos (gDNA) das cepas de *S. sanguinis* SK36 e DSS-10 foram extraídos e purificados a partir de 1,5ml de culturas em BHI (18h, 37°C, 10%CO₂), utilizando-se o sistema *MasterPure*[™] (Epicentre Technologies, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

A qualidade do DNA extraído foi avaliada pela razão das absorbâncias ($A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$) e a integridade das amostras de DNA comprovada em gel de 1% agarose (Sigma-Aldrich[®], EUA), corado com 0,15 μ l/ml de brometo de etídio, sob luz ultravioleta (UV). Os gDNAs foram estocados a -20°C para posterior utilização.

O DNA plasmidial (pDNA) foi purificado de culturas de *E. coli* por extração alcalina, como descrito por Birnboim e Doly (1979). Resumidamente, a cepa de *E. coli* contendo o plasmídeo pVA838 foi reativada em meio de cultura LB agar contendo 100 μ g/ml de eritromicina e incubadas em aerobiose, 37°C por 24h. Colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5ml de caldo LB com 100 μ g/ml de eritromicina e incubadas a 37°C em aerobiose com agitação constante por 18h. A seguir, células obtidas de 3ml de cultura foram separadas por centrifugação (10.000xg, 5min.) lavadas com 1ml de solução salina (NaCl 0,9%), lisadas pela adição de lisozima (Sigma-Aldrich[®], EUA) 2mg/ml, e o pDNA separado do gDNA através de precipitação sob alto pH (pH 12 – 12.5) e alta concentração de sais (Acetato de Sódio, 3.0 Molar). A seguir, o sobrenadante

contendo pDNA foi purificado, utilizando-se fenol-clorofórmio, e lavado com etanol, para a remoção de sais. Após secagem, o pDNA foi ressuspendido em 50µl de solução estéril de TE (Tris-HCL 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0), contendo RNase A (Invitrogen™, EUA) na concentração final de 50µg/ml. As amostras de pDNAs foram estocadas a -20°C para posterior utilização.

4.4. DELINEAMENTO DE *PRIMERS* ESPECÍFICOS PARA A CONSTRUÇÃO DO MUTANTE *KNOCK-OUT VICK* E PARA A ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE POSSÍVEIS GENES DE VIRULÊNCIAS DE *S. SANGUINIS* ATRAVÉS DE REAÇÕES DE qRT-PCR.

Os pares de *primers* específicos para amplificar o gene de resistência à eritromicina e para amplificar os produtos das sequências que flanqueiam *vick* (variando entre 340 a 570pb) foram delineados com o auxílio do programa *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu>). A especificidade dos pares de primers para *S. sanguinis* foi confirmada através da análise de BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) contra o genoma da cepa *S. sanguinis* SK36 (acesso: NC_009009, em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), e a análise do tamanho e especificidade dos amplicons em géis de agarose. Quando necessário, a manipulação de sequências ocorreu utilizando-se o *BioEdit 7* (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/>). As sequências dos pares de *primers* para a construção do mutante utilizados neste estudo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados na estratégia de inativação do gene *vick* através de mutagênese por PCR e ligação.

PRIMERS	SEQUENCIA 5'-3'^A	TAMANHO APROXIMADO DO PRODUTO; ALVO
E1-<i>AscI</i>	TTGGCGCGCC TGGCGGAAACGTAAAAGAAG	1000pb
E2-<i>XhoI</i>	TTCTCGAGG GCTCCTTGGAAGCTGTCAGT	Gene de resistência à eritromicina. Plasmídeo pVA838.
P1	CTGCTAAGGACAGTGAGTTTGA	564pb
P2-<i>AscI</i>	TTGGCGCGCC AATAACAGCAAGGCAACAATA	459pb a montante da ORF de <i>vick</i> a 95pb da ORF do gene <i>vick</i>
P3-<i>XhoI</i>	TTCTCGAG GCTTTATCTGGGCTAAGAGTGA	349pb
P4	AGCCAATACACCAACACCAT	1237pb da ORF de <i>vick</i> a 228pb a jusante da ORF <i>vick</i>

^AAs sequências sombreadas correspondem aos sítios de restrição inseridos em cada *primer*. Em negrito, encontram-se as sequências homólogas ao genoma de *S. sanguinis*.

Os pares de *primers* específicos para a análise da regulação de possíveis genes relacionados à virulência em *S. sanguinis* foram delineados (seção 3), delimitando produtos de tamanho entre 140 e 210pb, objetivando a quantificação dos respectivos transcritos a partir do *pool* de cDNA obtido nas reações de transcriptase reversa com *primers* arbitrários.

Primers para o gene *16SRNA*r, gene que codifica o rRNA da menor subunidade ribossômica de eubactérias, também foi delineado e utilizado como gene de referência, ou seja, demonstrando padrão de expressão constante entre mutante SKvicK e a WT *S. sanguinis* SK36 nas diferentes fases de crescimento planctônico testadas.

Os *primers* delineados para essa fase da pesquisa encontram-se na Tabela 2, e foram utilizadas as mesmas ferramentas citadas anteriormente, como o *Primer 3* e, quando necessário, *BioEdit 7*. A especificidade dos pares de *primers* foi confirmada através da análise de BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> 2011-02-

22) contra o genoma da cepa *S. sanguinis* SK36 e análise do tamanho dos produtos de amplificação em gel de agarose.

Tabela 2 - Primers utilizados nas reações de qPCR.

PRIMERS (qPCR)	SEQUENCIA 5'-3' (FORWARD//REVERSE)	TAMANHO APROXIMADO DO PRODUTO
16SRNAr	CGTAAACGATGAGTGCTAGGTG//TAGAGCGGTCAGAGGGATGT	204 pb
SSA_0019 (ssapcsB)	CAAGTCAACGAGATTCAAGGC//TTTGTTTGGGTACTGCGAGC	182 pb
SSA_0094 (lysM)	TGAGCCAACAACCTTACAATGC//CTGGGCGGTAGAGACTAAATTC	155 pb
SSA_0304 (cwdP)	AGGGTTATGCAACAGGAAATG//CGGATTAAAGTAGCCACGATAG	176 pb
SSA_0391 (spxB)	AATGTGAAGAACAACCAAACTG//TCATGTGAAGGTGACGAGTAGA	178 pb
SSA_0613 (gtfP)	TCGTCTATCCTTGCTTTATTCG//ACGGTCTGCACTTCACTATCA	165 pb
SSA_0721 (sodA)	CTTTTCTGGGAATTGATGACAC//GGAGTATCCTGATTTGCTGTTG	206 pb
SSA_1543 (pmC)	TCAAGAATACCTACCTGAAGCA//ATAGCCAAAGTGAAGGACATAAA	153 pb
SSA_1576 (ccpA)	TATTTGGAATGACAACGCCTAC//AGTGAATGGAACAAGAACGTC	143 pb
SSA_2378 (comE)	GGACAGCGATGATTTTCGTA//AGCTCTCATAACTTCGGATTG	197 pb

4.5. CONSTRUÇÃO DO MUTANTE *KNOCKOUT* DE *vick* EM *S. SANGUINIS*.

A inativação do gene *vick* foi realizada através de recombinação homóloga com alelos contendo o gene alvo e o cassete de resistência à eritromicina, os quais foram construídos através da estratégia de mutagenese por

PCR e ligação (*PCR ligation mutagenesis*) (Lau *et al.*, 2002), com algumas modificações (Stipp *et al.*, 2008; Duque *et al.*, 2011), conforme o ilustrado na Figura 3.

Os *primers* P2 e E1 contêm nas suas extremidades 5' as sequências do sítio de restrição da endonuclease *AscI* (5'-GG[^]CGCGCC-3'). Os *primers* P3 e E2 contêm o sítio reconhecido pela endonuclease *XhoI* (5'-C[^]TCGAG-3').

O gene de resistência à eritromicina (*erm^I*) foi amplificado do plasmídeo pVA838 (*gene info* [gi]: 13442777) através dos pares de *primers* E1/E2. A partir do gDNA extraído da cepa selvagem, as regiões flanqueando o gene alvo foram amplificadas com pares de *primers* específicos (P1/P2 e P3/P4).

As reações de PCR da construção foram realizadas com enzima Taq DNA polimerase de alta fidelidade com atividade *proof reading* (Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen™, EUA). Para isto, as reações de PCR para os pares de *primers* E1/E2, P1/P2 e P3/P4 foram compostas por: 38,8µl de H₂O ultra pura, 5µl de Tampão PCR 10X, 1µl de dNTPs Mix 10mM, 2µl de MgSO₄ 50mM, 1µl de *Primer Forward* 10µM, 1µl de *Primer Reverse* 10µM, 0,2µl de Taq DNA Polimerase HF e 1µl de DNA molde (gDNA ou pDNA). O ciclo térmico de amplificação da reação P1/P2 consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 60s, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 56°C por 30s e extensão a 68°C por 60s. Para as PCR com pares de *primers* E1/E2 e P3/P4, a temperatura de anelamento foi de 57°C. Volumes de 7µl dos produtos de PCR foram analisados em géis de agarose a 2% corados com 0,15µg/ml de brometo de etídio, sob luz UV (Figura 4).

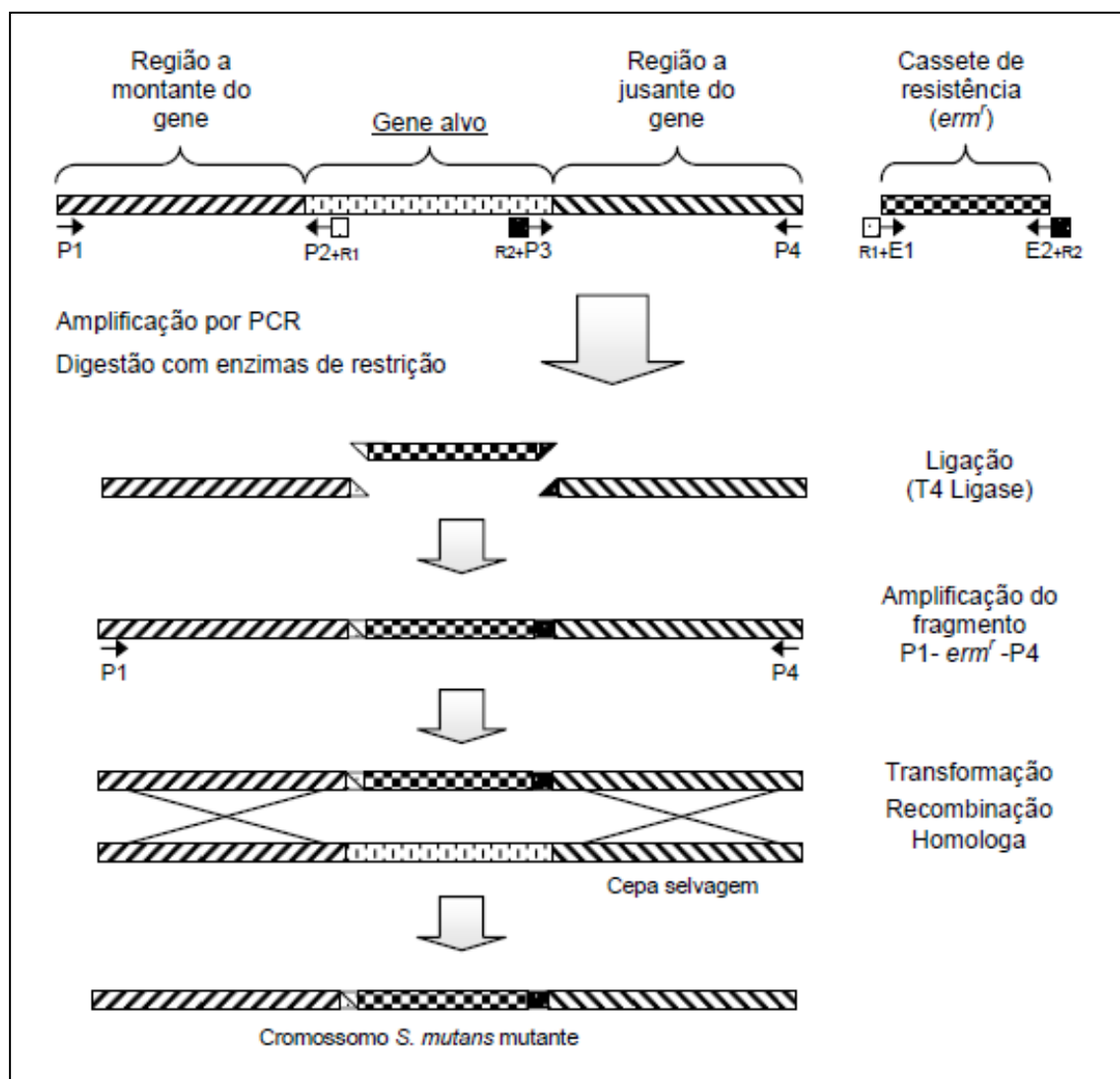


Figura 3 - Estratégia de inativação gênica utilizando-se a técnica de mutagenese por PCR e ligação. FONTE: adaptado de Lau *et al.*, 2002.

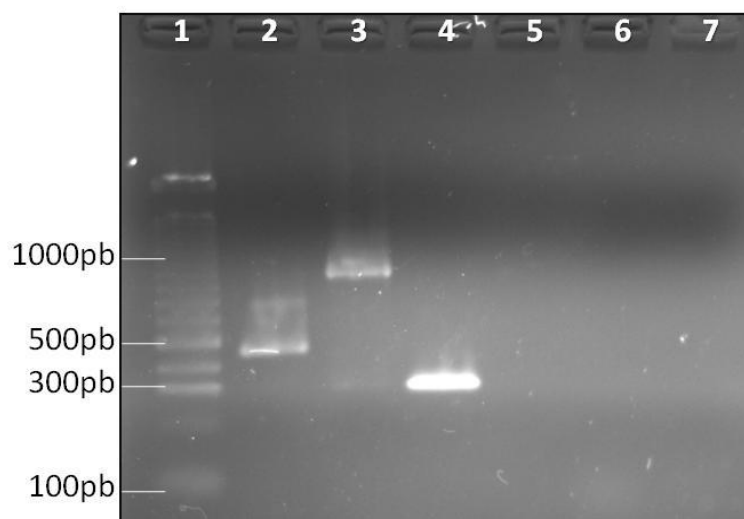


Figura 4 – Gel de agarose (2%) contendo 7µl de produtos de PCR utilizados para construção do mutante *vicK*. Canaleta 1: 0,9µg de padrão molecular 100pb (Invitrogen™, EUA). Canaleta 2 e 4: produtos obtidos com P1/P2 e P3/P4 a partir do DNA genômico da cepa selvagem SK36, respectivamente. Canaleta 3: produto obtido com E1/E2 a partir do pVA838. Canaletas 5 a 7: controles negativos das reações de PCR - reações dos *primers* P1/P2, E1/E2 e P3/P4 na ausência de DNA molde, respectivamente.

Após a análise da integridade e especificidade das reações, os produtos foram purificados utilizando-se o sistema *StrataPrep® PCR Purification Kit* (Stratagene, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados de P1/P2 e E1/E2 foram individualmente digeridos com a endonuclease *AscI* (New England BioLabs®, EUA) e os produtos purificados P3/P4 e E1/E2 foram digeridos com a endonuclease *XhoI* (Invitrogen™, EUA). Para as reações de digestão foram utilizados 8µl de produto purificado, 9µl de H₂O ultra-pura, 2µl de tampão de reação da enzima 10X e 1µl da enzima específica. As amostras de digestão foram incubadas a 37°C durante 16h e as reações paralisadas através de incubação por 20min a 65°C.

Os produtos digeridos foram novamente purificados utilizando-se o sistema *StrataPrep® PCR Purification Kit* (Stratagene, EUA) e submetidos a reação de ligação com DNA ligase T4 (Invitrogen™, EUA). Para isto, as amostras de ligação consistiram de 9,2µl de H₂O ultra-pura, 4,8µl de tampão 5X, 2µl da

enzima T4 ligase (Invitrogen™, EUA). Como DNA molde, foram utilizados 4µl de E1/E2 e 4µl de P1/P2, ambos digeridos por *AscI* (Ligação A) ou 4µl de E1/E2 e 4µl de P3/P4, ambos digeridos por *XhoI* (Ligação B).

As ligações A e B foram individualmente amplificadas com os *primers* distais. Para a ligação A, foram utilizados os *primers* P1/E2, enquanto que para a ligação B foram utilizados os *primers* E1/P4. As reações de PCR foram compostas por: 37,25µl de H₂O ultra pura, 5µl de tampão PCR 10X, 1µl de dNTPs Mix 10mM, 2,5µl de MgSO₄ 50mM, 1,5µl de *Primer Forward* 10µM, 1,5µl de *Primer Reverse* 10µM, 0,25µl de Taq DNA Polimerase HF e 1µl de DNA molde (reação de ligação). Cada ciclo térmico de amplificação consistiu de desnaturação inicial 95°C por 60s, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 56°C por 30s e extensão 68°C por 60s. Para a análise da integridade e especificidade das reações, 10µl e 4µl dos produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,7% corado com 0,15µl/ml de brometo de etídio, sob luz UV (Figura 5).

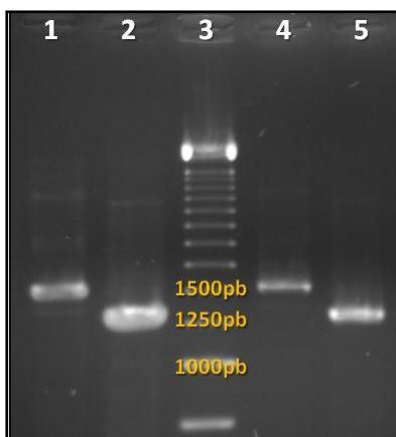


Figura 5 - Gel de agarose (1,7%) contendo 10µl e 4µl de produtos de PCR, utilizados na construção do inserto para inativação de *vicK*. Canaleta 1 e 2: 10µl de produtos de PCR obtidos com pares de *primers* P1E2 (aprox. 1541pb) e E1P4 (aprox. 1326pb). Canaleta 3: 0,9µg de padrão molecular 250pb (Invitrogen™, EUA). Canaletas 4 e 5: 4µl de produtos de PCR obtidos com pares de *primers* P1/E2 (Aprox. 1541pb) e E1/P4 (aprox. 1326pb).

Após a análise da integridade e especificidade das reações, os produtos foram purificados utilizando-se o sistema *StrataPrep® PCR Purification Kit* (Stratagene, EUA) e submetidos à nova amplificação, com *primers* P1/P4, forçando a interação entre P1/P4 e P1/E2 através da região homóloga presente em ambos os produtos (gene *erm^r*), o que gerou grandes quantidades de fragmentos recombinantes P1-*erm^r*-P4. A reação de PCR foi composta por: 37,25µl de H₂O ultra pura, 5µl de Tampão PCR 10X, 1µl de dNTPs Mix 10mM, 2,5µl de MgSO₄ 50mM, 1,5µl de *Primer Forward* 10µM, 1,5µl de *Primer Reverse* 10µM, 0,25µl de Taq DNA Polimerase HF e 1µl de DNA molde (0,5µl de E1/P4 purificado e 0,5µl de P1/E2 purificado). Como controle positivo da reação de PCR, foi utilizado o DNA da cepa selvagem. Cada ciclo térmico de amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 60s, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 58°C por 30s e extensão a 68°C por 120s. Para a análise da integridade e especificidade das reações, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, corado com 0,15µl/ml de brometo de etídio, sob luz UV (Figura 6).

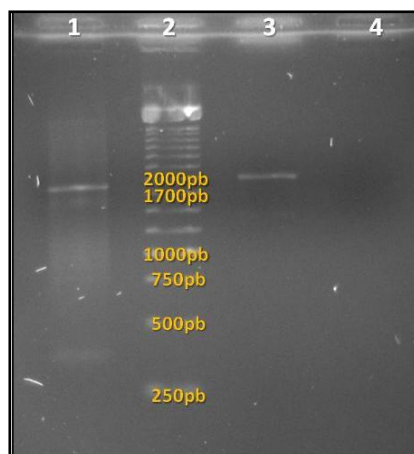


Figura 6 - Gel de agarose (1,7%) contendo de produtos de PCR, utilizados na construção do inserto para inativação de *vicK*. Canaleta 1: 8µl do produto de PCR obtidos com P1/P4 (aprox. 1888pb). Canaleta 2: 1µg de Padrão molecular 250pb (InvitrogenTM, EUA). Canaleta 3: 8µl de produto de PCR obtidos com DNA de SK36 (aprox. 2037pb). Canaleta 4: controle negativo da reação de PCR.

O produto P1-*erm^r*-P4 foi purificado, a concentração de DNA determinada em espectrofotômetro ($A_{260\text{nm}}$), e a seguir utilizado para transformar as cepas de *S. sanguinis* (Item 4.6).

4.6. ENSAIOS DE TRANSFORMAÇÃO DE *S. SANGUINIS* SK36 E RASTREAMENTO DOS MUTANTES.

Um total de 10µg dos fragmentos recombinantes purificados (P1- *erm^r* – P4) foi utilizado para a transformação natural dos genótipos de *S. sanguinis*. Os ensaios de transformação natural das cepas *S. sanguinis* foram adaptados de ensaios previamente aplicados para outras espécies naturalmente competentes como *S. mutans* e *S. gordonii* (Perry & Kuramitsu, 1981; Wang *et al.*, 2002). *S. sanguinis* SK36 demonstrou alta frequência de transformação através do ensaio descrito a seguir.

De acordo com o protocolo de Perry & Kuramitsu (1981) para a transformação de *S. mutans*, 150µl de soro de cavalo inativado pelo calor foram adicionados a 2ml de THB (Difco Labs, EUA) e aquecidos a 37°C, adicionando-se, posteriormente, 50µl de cultura *overnight* (18h) de *S. sanguinis* em meio THB fresco. Essa suspensão foi incubada em aerobiose a 37°C, por 4h ($A_{550\text{nm}} \approx 0,2$). Volumes de 500µl destas culturas foram transferidos para tubos com 500µl de meio THB fresco pré-aquecido a 37°C, aos quais, imediatamente, adicionou-se o DNA recombinante (10µg). A seguir, os frascos foram incubados a 37°C em aerobiose por 90min, e alíquotas dessas culturas foram plaqueadas em BHA contendo 10µg/ml de eritromicina. As placas foram incubadas a 37°C, por 48h, em atmosfera de 10%CO₂. Através deste protocolo, muitos transformantes (mínimo de 30 colônias) foram obtidos para *S. sanguinis* SK36 e *S. mutans* e, em menor número, para *Streptococcus gordonii* Challis, sendo as últimas espécies utilizadas, nesse caso, como controle, em que foi utilizado o plasmídeo pVA838, o qual não é recombinante com o gDNA das referidas espécies.

Não foi possível recuperar transformantes da cepa *S. sanguinis* DSS-10 através do protocolo acima descrito, então, utilizaram-se outras condições consideradas ideais para transformação de *S. gordonii* (Challis) (Wang *et al.*, 2002). Assim, transferiram-se 150µl de cultura de *S. sanguinis*, (18h em meio de cultura THB, 37°C, 10%CO₂) para um microtubo contendo 1ml de THB com 10% de soro de cavalo inativado. Após incubação em aerobiose a 37°C, por 60min, adicionaram-se 10µg de DNA recombinante e a incubação continuou por mais 2h. Após isto, volumes de 100µl dessas suspensões foram plaqueados em placas de Petri contendo BHA com 10µg/ml de eritromicina (BHE). As placas foram incubadas a 37°C, por 48h, em atmosfera de 10%CO₂. Nestas condições, um alto número de transformantes foi obtido para *S. gordonii* (controle), mas não para *S. sanguinis* DSS-10, indicando que, em diferentes condições para transformação de cepas de *S. mutans*, *S. gordonii* e *S. sanguinis* SK36, a cepa DSS-10 apresenta fenótipo de baixa competência.

Para rastreamento inicial dos transformantes recuperados em placas de BHA com 10µg/ml de eritromicina, foram realizadas reações de PCR contendo os primers E1/E2, utilizando-se como *template* as colônias de cada clone rastreado (*colony-PCR*). Os transformantes contendo o cassete de resistência tiveram os gDNAs purificados, os quais foram utilizados em reações de PCR utilizando-se diferentes combinações de primers (P1/P4, P1/P2, P3/P4 e P1E2). Os mutantes recuperados foram cultivados em meio de cultura acrescido de 10µg/ml de eritromicina e estocados a -20°C e -70°C, em meio *skim milk* (Difco Labs, EUA) e em BHI glicerol 80%, respectivamente.

Um dos mutantes corretos obtidos a partir da cepa *S. sanguinis* SK36 foi denominado SKvicK. Não foi possível obter mutantes a partir da cepa *S. sanguinis* DSS-10, uma vez que esta cepa demonstrou ausência de transformação natural, quando comparada com a cepa SK36, sendo, assim, utilizada em apenas alguns experimentos, como mais uma cepa representativa de *S. sanguinis*.

4.7. COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO PLANCTÔNICO EM AEROBIOSE, ANAEROBIOSE E MICROAEROFILIA.

Os ensaios de crescimento planctônico foram realizados em tubo plástico com tampa rosqueável de capacidade 50ml (CralPlast, Brasil) contendo o total de 25ml de caldo BHI (anaerobiose e 10%CO₂) e garrafas de vidro com capacidade de 200ml (Schott Duran®, Alemanha) contendo o total de 50ml de caldo BHI (aerobiose). A partir de cultura *starter* (seção 4.2), 500μl dos inóculos (normalizados pelas A_{550nm} das culturas) foram transferidos para os tubos plásticos e garrafas de vidro contendo, respectivamente, 24,5ml e 49,5ml de meio fresco pré-aquecidos e incubados de zero a doze horas a 37°C em aerobiose (sob agitação), anaerobiose (10%H₂, 10%CO₂, 80%N₂) e 10%CO₂, a depender do experimento. Alíquotas das culturas (500μl) foram retiradas de uma em uma hora, para determinação das curvas de crescimento (A_{550nm} *versus* Tempo). Três ensaios independentes foram realizados em duplicata.

4.8. ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES SOB DIFERENTES CONDIÇÕES ATMOSFÉRICAS.

4.8.1. BIOFILMES MADUROS (18H) EM PLACAS DE MICROTITULAÇÃO.

Em um primeiro momento, a caracterização da capacidade de crescimento em biofilme de todas as cepas (selvagens e mutantes) foi realizada em placas de microtitulação de 96 poços estéreis, *round-bottom* (fundo em “U”) e sem tratamento para adesão celular (Referência: 650111, CralPlast, Brasil), escolhendo-se a cepa *S. mutans* UA159 como controle positivo, visto que a mesma demonstra boa capacidade de formação de biofilmes, conforme as condições descritas por Mattos-Graner *et al.* (2001).

Dessa forma, colocaram-se, nas placas de microtitulação de 96 poços, volumes de 180µl de meio caldo BHI acrescido de sacarose 0,1%, inoculando-se, a seguir, volumes de 20µl de culturas de 18h (acrescidos de eritromicina quando necessário), com normalização das absorbâncias (A_{550nm}), totalizando um volume de 200µL/poço. As placas foram incubadas por 18h, a 37°C, em anaerobiose (10% H_2 , 10% CO_2 , 80% N_2), aerobiose (sob agitação), ou microaerofilia (10% CO_2).

Após incubação por 18h, os sobrenadantes das placas contendo os biofilmes foram removidos para uma placa de microtitulação de 96 poços estéril, *flat-bottom* (Referência: 655111, CralPlast, Brasil) e sem tratamento para adesão celular, sendo, posteriormente, determinadas as absorbâncias (A_{550nm}) em leitor de ELISA (VersaMAX, Molecular Devices, EUA) e correspondendo a absorbância do crescimento planctônico.

Os biofilmes, das placas incubadas por 18h, foram lavados três vezes com água destilada, objetivando a remoção das células fracamente aderidas. Após secagem por 30 min. em temperatura ambiente (TA), os biofilmes foram corados com solução aquosa de cristal violeta a 1% durante 15 min. e a seguir lavados por três vezes com água destilada e deixados para secar em TA. O corante dos biofilmes foi solubilizado durante incubação com etanol 100% (200µl por poço) por 30 min. em TA. Após, volumes de 100µl da solução foram transferidos para nova placa de microtitulação com fundo chato (*flat-bottom*) e as absorbâncias (A_{575nm}) medidas em leitor de ELISA (VersaMAX, Molecular Devices, EUA).

Ensaio semelhante foram realizados em placas de poliestireno tratadas para adesão celular (Corning Incorporated, EUA) e com diferentes meios de cultura [THB e TSB (*Tryptic Soy Broth*), Merck Labs, Alemanha]. Foi também comparado o crescimento em meios sem sacarose e meios acrescidos de sacarose nas concentrações de 0,01% e 1% nas diferentes condições atmosféricas já previamente citadas. Como controles negativos foram utilizados meios de cultura sem inóculo bacteriano.

4.8.2. BIOFILMES EM ESTÁGIO INICIAL (2 E 4H) EM SUPERFÍCIES TRATADAS OU NÃO COM SALIVA.

Para os ensaios de formação de biofilme sobre componentes salivares, amostras de saliva total foram coletadas de um voluntário adulto saudável (a pesquisadora desse estudo) segundo o protocolo utilizado por Shelburne III *et al.* (2005) com algumas modificações. A voluntária em questão tinha, à época da coleta, 29 anos de idade, não apresentava nenhuma doença sistêmica e não fez uso de nenhum medicamento, como antibióticos e antifúngicos, durante o tempo de coleta. Caso houvesse a necessidade de fazer uso de algum medicamento, as coletas teriam de ser suspensas por até duas semanas após o tratamento.

A salivação foi estimulada através da mastigação de um pedaço de papel Parafilm® (Parafilm “M” Laboratory Film, American Company) por 5min e coletada em tubo plástico cônico com tampa rosqueável com capacidade total de 50ml (CralPlast, Brasil) mantidos em banho de gelo, até que totalizassem 20ml de saliva. Essas coletas foram realizadas em intervalos de 24h objetivando um *pool* salivar de aproximadamente 500ml. Aos volumes de 20ml de saliva foram acrescentados 50µl de DTT (DL-Dithiothreitol) a 1mM (Sigma-Aldrich®, EUA), as amostras homogeneizadas por inversão e clarificadas através de centrifugação (Centrífuga Eppendorf® 5810R; 17.709rcf por 15 min, 4°C) e filtradas, sob vácuo, em filtros com poros de 0.22µm de diâmetro (*Steritop-GP Filter Unit*, 250ml, Ref. SCGPT02RE, Millipore™, EUA), sendo armazenadas em garrafa de vidro (Schott Duran®, Alemanha) estéril e estocada em ultra-freezer -70°C até o momento de realização dos ensaios.

Para os ensaios de formação de biofilmes, as amostras de saliva foram descongeladas em banho de gelo e utilizadas para tratar as lamínulas de vidro estéreis (10x10mm). Assim, 1ml de saliva humana foi colocado nos poços da microplaca com 24 poços (nº. 3337, Corning®, EUA), previamente contendo as lamínulas, e incubadas *overnight* em geladeira a 4°C. Lamínulas sem tratamento com saliva foram utilizadas como controle.

As WT *S. sanguinis* SK36 e *S. mutans* UA159, e as respectivas mutantes SKvicK e UAvicK, foram utilizadas em ensaios para verificar a formação de biofilme inicial *in vitro* (2h) em presença de saliva, visto que em virtude de *S. sanguinis* ser um colonizador primário na formação de biofilmes em cavidade bucal, esse microrganismo talvez necessite de proteínas salivares para que possa se adsorver e iniciar o processo de formação de biofilme.

A seguir, acrescentou-se em cada poço 1,5ml de meio caldo BHI acrescido 1% de sacarose e 166µl de culturas bacterianas *overnight* (18h) normalizadas obtidas conforme seção 4.2. As placas foram então incubadas por 2h em anaerobiose (37°C; 10%H₂, 10%CO₂, 80%N₂) ou em aerobiose (37°C; Incubadora “Shaker” – NT 712, Nova Técnica, Brasil; agitação com velocidade 80rpm). Posteriormente, retirou-se a solução de BHI com sacarose, colocando-se 1,5ml de solução salina 0,9% (NaCl 0,9%) em cada poço, agitando-se, gentilmente, por 15 min. em agitador de placas (Agitador Micro Placas – MA 562, Marconi Equipamentos, Brasil). Este procedimento de lavagem foi realizado por mais duas vezes. Este procedimento foi realizado também se incubando as placas por 4h em anaerobiose (37°C; 10%H₂, 10%CO₂, 80%N₂) ou em aerobiose (37°C; Incubadora “Shaker” – NT 712, Nova Técnica, Brasil; agitação com velocidade 80).

As lamínulas foram, então, fixadas com 800µl de solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma-Aldrich®) por 30 min com a placa completamente imóvel e em TA. Em seguida, realizou-se o processo de desidratação com soluções de etanol com concentrações crescentes (50 a 100%), durante 15 min cada. Após a desidratação, as lamínulas secaram em TA e, posteriormente, montadas em *stubs* de 3x3cm para serem metalizadas com ouro, analisadas através de microscopia eletrônica de varredura – MEV, obtendo-se imagens com aumento de 1.300x (Jeol JSM5600 LV, FOP/UNICAMP).

4.9. ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR DAS CEPAS SELVAGEM E MUTANTE DE *S. SANGUINIS* ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).

As cepas de interesse (*S. sanguinis* SK36 e *S. mutans* UA159, e respectivas mutantes *vick*) foram reativadas conforme o relatado na seção 4.2 e, a partir do inóculo *starter*, foram inoculadas de acordo com a seção 4.7, e incubadas, na atmosfera de interesse, até alcançarem a absorbância de A_{550nm} de 0,300 ($\pm 0,010$).

Posteriormente, coletaram-se 1ml das culturas se colocando em microtubos para centrífuga (MCT-150, Axygen, EUA) e, então, separadas por centrifugação (11.000xg, 1 min), ressuspensando o *pellet* em 1ml de solução salina (NaCl 0,9%), centrifugando novamente (11.000xg, 1 min). Desprezou-se a solução salina e fixou-se as células, obtidas por centrifugação, em 1ml solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma-Aldrich®, EUA), agitando-se em vórtex. Colocou-se a solução de células acrescidas de glutaraldeído 2,5% (Sigma-Aldrich®, EUA) sobre lamínulas de vidro estéreis, previamente colocadas em microplacas com 24 poços (Corning®, EUA), de modo que a solução cobrisse toda a lamínula, e se deixou secar em estufa a 60°C. Quando as lamínulas secaram, executou-se a desidratação com soluções de etanol em concentrações crescentes (50, 60, 70, 80, 90 e 100%). Após a desidratação, as lamínulas secaram em TA e foram metalizadas com ouro e posterior análise em MEV (Jeol JSM5600 LV, FOP/UNICAMP).

4.10. ANÁLISE DA HIDROFOBICIDADE CELULAR EM AEROBIOSE, ANAEROBIOSE E MICROAEROFILIA.

Cepas mutantes e selvagens foram testadas quanto à hidrofobicidade celular, conforme descrito por Rosenberg *et al.* (1981) e Duque *et al.* (2011). As cepas de interesse foram reativadas conforme o relatado na seção 4.2 e, a partir

do inóculo *starter*, foram inoculadas de acordo com a seção 4.7, e incubadas, na atmosfera de interesse, até que alcançassem a metade da fase exponencial (A_{550nm} de 0,300) ($\pm 0,010$).

Os tubos foram centrifugados (Centrífuga Eppendorf® 5810R; 5000rcf, 5 min), descartando-se os meios de cultura e lavando os *pellets* com solução salina 0,9% (NaCl 0,9%), seguida de nova centrifugação e descarte, novamente, da solução salina.

As amostras foram ressuspensas em tampão PUM contendo 22,2g de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 7,26g de KH_2PO_4 , 1,8g de ureia (Sigma-Aldrich®, EUA), e 0,2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (Synth®, Brasil) por litro e com pH 7.1, e ajustada a uma absorbância (A_{550nm}) a 0,900 ($\pm 0,010$). Posteriormente, 4ml destas suspensões foram transferidas para novos tubos de ensaio de vidro e acrescidas de 533µl de hexadecano (Sigma-Aldrich®, EUA). As amostras foram incubadas a 30°C por 15min, agitadas em vórtex por 30seg e incubadas por mais 15 min antes da determinação das absorbâncias finais (A_{550nm}), dosando-se 500µl da parte líquida. Três ensaios independentes foram realizados em duplicata. Como controle, suspensões bacterianas sem o hexadecano foram tratadas com as mesmas condições físicas para determinação das A_{550nm} .

4.11. ENSAIOS DE AUTÓLISE CELULAR EM AEROBIOSE E ANAEROBIOSE.

Os ensaios para determinação da atividade autolítica das cepas WT *S. sanguinis* SK36 e DSS-10, e *S. mutans* UA159, e respectivas mutantes *vick* (SKvick e UAvick), foram realizados conforme o descrito por Duque *et al.* (2011), com algumas modificações.

As cepas do estudo foram reativadas conforme o descrito na seção 4.2 e, a partir do inóculo *starter*, foram inoculadas de acordo com a seção 4.7, e incubadas, na atmosfera de interesse, até que alcançassem a metade da fase exponencial (A_{550nm} de 0,300) ($\pm 0,010$).

Os tubos foram centrifugados (Centrífuga Eppendorf® 5810R; 5000rcf, 5 min), e os *pellets* bacterianos ressuspensos em tampão de autólise contendo 1,36g de KH_2PO_4 20mM, 37,27g de KCl 1M, 0,0735g de CaCl_2 1mM, 0,10165g de MgCl_2 1mM, 0,4% de Ázida Sódica (Sigma-Aldrich®, EUA) para cada 500ml de solução e com pH 6.5, e ajustada a uma absorbância ($A_{550\text{nm}}$) de 0,900 ($\pm 0,010$).

Posteriormente, volumes de 4ml de cada suspensão foram transferidos para novos tubos de ensaio de vidro, os quais foram incubados a 44°C, com as tampas fechadas, por 72h em atmosfera de aerobiose ou 10% CO_2 . As absorbâncias destas suspensões foram mensuradas a cada 24h, agitando-se em vórtex e retirando-se alíquotas de 500 μl . Três ensaios independentes foram realizados em duplicata.

4.12. SENSIBILIDADE AO ESTRESSE OXIDATIVO EM AEROBIOSE E ANAEROBIOSE.

As cepas mutantes SKvicK e UAvicK e as respectivas selvagens, *S. sanguinis* SK36 e *S. mutans* UA159, foram testadas quanto à sensibilidade ao estresse oxidativo, como descrito por Higuchi *et al.* (1999).

As cepas do estudo foram reativadas conforme descrito na seção 4.2 e, a partir do inóculo *starter*, foram inoculadas de acordo com a seção 4.7, e incubadas, na atmosfera de interesse (aerobiose e anaerobiose), até que alcançassem a absorbância $A_{550\text{nm}} \sim 0,180-0,200$. Após isto, as culturas foram acrescidas de 40 μl de H_2O_2 ($[\text{C}_i]$ igual a 10 μM ; Dinâmica, Brasil) e a incubação mantida por 1h em TA. Seguida de uma dose letal de 400 μl de H_2O_2 ($[\text{C}_i]$ igual a 100 μM ; Dinâmica, Brasil), incubando as culturas por 30 min em TA. Depois, fizeram-se diluições seriadas das culturas, as quais foram plaqueadas em placas com BHA ou BHE colocando-se 3 gotas com volume de 25 μl em cada uma das diluições, e incubadas a 37°C em microaerofilia (37°C, 10% CO_2), para contagem do número de células viáveis (*ufc* – unidades formadoras de colônia). Três ensaios independentes foram realizados em duplicata.

4.13. ANÁLISES COMPARATIVAS DA EXPRESSÃO DOS GENES *GTFP*, *SSAPCSB*, *LYSM*, *PMC*, *COME*, *SPXB*, *CWDP*, *SODA* E *CCPA* ENTRE A CEPA SELVAGEM *S. SANGUINIS* SK36 E A MUTANTE *SKvicK*

A Tabela 3 descreve as principais características e funções dos genes possivelmente regulados por VicRK e/ou com papel no crescimento em biofilmes, biogênese do envelope celular e resistência ao estresse oxidativo e produção de H₂O₂.

Tabela 3 – Possíveis genes do regulon de VicRK em *S. sanguinis*.

Genes		Função provável*	Referências
<i>Locus tag</i>	Nome utilizado neste trabalho		
SSA_0019	<i>ssapcsB</i>	Proteína ortóloga da GbpB de <i>S. mutans</i> . Homologia a hidrolases de mureína. Envolvida na biogênese de parede celular e formação de biofilmes em <i>S. mutans</i> .	Ng <i>et al.</i> , 2003; Ng <i>et al.</i> , 2004; Ng <i>et al.</i> , 2005 BLAST
SSA_0094	<i>lysM</i>	Biogênese de parede celular.	Duque <i>et al.</i> , 2011; Stipp, 2010
SSA_0613	<i>gtfP</i>	Codifica a glucosiltransferase, responsável pela produção de glucanos.	BLAST
SSA_0391	<i>spxB</i>	Codifica a piruvato-oxidase, responsável pela produção de H ₂ O ₂	Zheng <i>et al.</i> , 2011
SSA_1576	<i>ccpA</i>	Codifica a Proteína A de Controle Catabólico, principal regulador da repressão catabólica do carbono. É um regulador negativo do gene <i>spxB</i> .	Zheng <i>et al.</i> , 2011
SSA_0304	<i>cwdP</i>	Codifica uma hidrolase de peptideoglicano (autolisina). Possui similaridade à autolisinas de <i>S. mutans</i>	Stipp, 2010
SSA_1543	<i>pmC</i>	Codifica proteína de membrana conservada (PMc) em <i>Streptococcus</i> . Possível papel na integridade do envelope celular.	Ng <i>et al.</i> , 2003; Ng <i>et al.</i> , 2004; Ng <i>et al.</i> , 2005
SSA_0721	<i>sodA</i>	Codifica uma enzima superóxido-dismutase. Participa da resistência ao estresse oxidativo.	Ahn & Burne, 2007
SSA_2378	<i>comE</i>	Gene regulador de resposta do SDC <i>ComCDE</i> . Relacionado à competência celular e regulação da produção de bacteriocinas em <i>S. mutans</i> .	Hung <i>et al.</i> , 2011

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

4.13.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

Previamente, células de *S. sanguinis* SK36 e a respectiva cepa mutante SKvicK foram coletadas em duas partes da fase logarítmica, uma fase *mid-log* e uma fase *late-log* (antes que as células entrem na fase estacionária do crescimento planctônico), tanto em aerobiose quanto em anaerobiose.

Na fase *mid-log*, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, a absorbância (A_{550nm}) foi 0,300 para ambas as cepas. Na fase *late-log* em aerobiose, a absorbância (A_{550nm}) foi 0,400 para a cepa mutante SKvicK, enquanto que para a cepa WT SK36 a absorbância (A_{550nm}) foi 0,900. E na fase *late-log* em anaerobiose, a absorbância (A_{550nm}) foi 0,900 para a cepa *S. sanguinis* SK36, enquanto que na respectiva mutante *vick* (SKvicK), a absorbância de coleta (A_{550nm}) foi 0,800.

As cepas de interesse foram reativadas conforme o relatado na seção 4.2 e, a partir do inóculo *starter*, foram inoculadas de acordo com a seção 4.7, e incubadas, na atmosfera de interesse, até que alcançassem a absorbância desejada. Os tubos contendo as culturas foram centrifugados (Centrífuga Eppendorf® 5810R; 5000rcf, 5 min, 4°C) e os *pellets* ressuspensos em 1ml de solução salina (NaCl 0,9%), colocados em tubos de microcentrífuga com rosca de capacidade 2ml (*Screw Tube*, Axygen, EUA) sendo, então, centrifugados (11.000rcf, 1min, 4°C), descartando-se o sobrenadante, congelando os respectivos *pellets* celulares em ultra-freezer -70°C para posterior extração e purificação do RNA.

Para a extração do RNA total, a quebra das células congeladas ocorreu na presença de $\approx 0,16g$ de *beads* de zircônia 0.1mm de diâmetro (Biospec, EUA) adicionado de 200 μ l de TE (Tris-HCL 10mM pH 8,0; EDTA 1mM pH 8,0) em aparelho de Mini-beadbeater (Biospec, EUA) em força máxima (2 ciclos de 45 seg com 45 seg de descanso em gelo).

Para a purificação do RNA total, usamos o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) seguindo o protocolo do fabricante. Antes do uso, o RNA foi tratado com 10U de *Turbo DNase* (Ambion, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

A determinação da concentração e pureza das amostras de RNA foi realizada através da leitura em NanoDrop® (Thermo Scientific, EUA). O material foi considerado puro quando a razão entre as leituras A_{260nm}/A_{280nm} foi igual ou superior a 1,8.

A integridade das amostras de RNA foi determinada através da separação eletroforética de 5µl de cada amostra em géis desnaturantes de agarose a 1,2% (com 1,8% de formaldeído) contendo 0,15µl/ml de brometo de etídio, em tampão de corrida (20mM MOPS, 5mM acetato de sódio e 1 mM EDTA). As imagens digitais dos géis foram obtidas sob luz UV. A presença das duas bandas definidas, correspondentes aos RNAs ribossômicos (23S e 16S) indicou integridade das amostras.

4.13.2. REAÇÕES DE RT-PCR

As reações de transcriptase reversa foram realizadas com as amostras de RNAs total utilizando-se os primers (Invitrogen™, EUA) 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, as reações de transcrição reversa foram realizadas com o sistema SuperScript III (Invitrogen™, EUA) segundo as recomendações do fabricante. Este sistema é capaz de detectar RNAm específico entre concentrações de 1pg à 5µg de RNA total.

Primeiramente, foi realizada a mistura contendo 4µg de RNA total livre de DNA, 3µl da mistura dos primers arbitrários (concentração final de 2µM para

cada oligo) (Chia *et al.*, 2001), 3µl de 10mM dNTP mix e H₂O DEPC q.s.p. 70µl. Cada mistura inicial foi aquecida a 65°C por 5min, e 4°C por 1min.

Um segundo microtubo, contendo 20µl de tampão RT 10X, 5µl de 0.1M DTT, 2,5µl de RNase OUT (40U/µl; Invitrogen™, EUA) e 2,5µl de SuperScript III (200U/µl; Invitrogen™, EUA) por amostra, foi preparado como solução-mãe, sendo 30µl dessa transferidos para cada tubo resfriado.

As reações de RT ocorreram com incubação a 25°C durante 10min, 50°C por 3h, e foi finalizada a 70°C por 15min em termociclador (*GeneAmp PCR System 2400*, Applied Biosystems, EUA). Após a reação, 300µl H₂O mili-Q foi adicionada para ajustar a concentração do produto para 10ng/µl. Os cDNAs obtidos foram estocados a -20°C, para posterior utilização nas reações de PCR quantitativo (qPCR). Os ensaios foram feitos com RNA de pelo menos três culturas independentes para cada amostra em cada condição atmosférica.

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 2,5µl de SuperScript III (200U/µl; Invitrogen™, EUA) por 2,5µl de H₂O DEPC. Estas amostras foram incluídas nas reações de qPCR, onde a ausência de amplificação demonstrou a ausência de DNA genômico contaminante na amostra de RNA tratado.

4.13.3. PCR QUANTITATIVO/QRT-PCR (REAL-TIME PCR)

A partir do *pool* de cDNA obtido em reação de RT-PCR, reações de qPCR foram realizadas para avaliar a expressão dos genes *spxB* (SSA_0391), *gtfP* (SSA_0613), *ssapcsB* (SSA_0019), *lysM* (SSA_0094), *pmC* (SSA_1543), *cwdP* (SSA_0304), *sodA* (SSA_0721), *comE* (SSA_2378) e *ccpA* (SSA_1576), os quais estão possivelmente envolvidos na estrutura do envelope celular, na formação de biofilmes e na sensibilidade ao estresse oxidativo. Os primers delineados para esses experimentos se encontram na Tabela 2.

As reações de PCR foram realizadas com o auxílio do aparelho *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA) que possibilitou a quantificação bruta, e em tempo real, da amplificação dos genes de virulência, normalizados pelo 16SRNAr.

Utilizaram-se, para os ensaios de PCR em tempo real, placas de 48 poços (*MicroAmp® Fast-Optical 48-well Reaction Plate*; Applied Biosystems, EUA), colocando-se, em cada poço da placa, um *mix* composto de: 5µl de H₂O mili-Q, 10µl do reagente *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, EUA), e 2µl do *Primer Mix*, correspondente ao par de *primer* específico do gene a ser amplificado. Utiliza-se como template: 3µl das diluições correspondentes à curva de DNA e 3µl para as amostras com o *pool* de cDNA de cada fase do experimento. Dessa forma, a reação final terá a quantidade de 20µl por poço. Os ensaios de qPCR foram feitos em duplicata, a partir de cada um dos três cDNAs independentes (seção 4.13.2.). Como um dos controles negativos da reação, *mix* sem cDNA foram incluídas para assegurar a ausência de DNA contaminante nos reagentes.

Cada ciclo térmico de amplificação consistiu de desnaturação a 94°C por 15seg; anelamento a 54°C (genes *cwdP*, *gtfP*, *spxB*), 58°C (genes *16SRNAr*, *ssapcsB*, *lysM*) e 60°C (*pmC*, *comE*, *ccpA*) por 15seg; e extensão a 72°C por 25seg, em um total de 40 ciclos.

Em cada corrida, realizou-se, em duplicata, uma curva de amplificação de gDNA (cepa WT SK36) em quantidades decrescentes: 300ng, 30ng, 3ng, 0,3ng e 0,03ng por poço. Essa curva de DNA é responsável pela eficiência da reação de qPCR, visto que as curvas de amplificação dos genes pesquisados devem se situar dentro da curva de DNA e essa eficiência é usada para se analisar a expressão gênica do ponto de vista estatístico.

As análises da expressão gênica foram realizadas com o *software* REST 2009 (QIAGEN, EUA), em que se utiliza as eficiências da reação de expressão gênica de cada ensaio em relação à eficiência da reação da expressão do gene de referência, neste caso o 16SRNAr, utilizando-se as mesmas amostras do ensaio

em questão. Para essa análise, também se faz necessário utilizar a média dos CTs (*Threshold Cycle* – ciclo de amplificação do gene) de cada amostra, visto que cada uma está em duplicata, comparando-se entre a cepa WT SK36 (*Control*) e a respectiva mutante SKvicK (*Sample*). Dessa forma, o *software* já indica se o gene está *DOWN*- ou *UP-regulated*, ou seja, se sua expressão diminuiu ou aumentou, respectivamente.

4.14. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.

Para realizar as análises estatísticas, utilizou-se o *software* BioStat 5.0. As comparações do crescimento planctônico (A_{550nm}) entre cepas foram realizadas para cada tempo estudado, através do Teste T de Student para amostras pareadas. Comparações dos fenótipos de hidrofobicidade e sensibilidade ao estresse oxidativo foram realizadas utilizando-se análises de variância (ANOVA), seguida da comparação entre grupos através do teste de Tukey. Análises de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis foram realizadas para comparações da atividade autolítica entre as cepas.

Utilizou-se o *software* Rest 2009 (QIAGEN, EUA) para analisar a expressão gênica, e esse software utiliza o Teste T com confidencialidade de 95%.

5. RESULTADOS

5.1. IDENTIFICAÇÃO DO SISTEMA DE DOIS COMPONENTES VicRK NO GENOMA DE *S. SANGUINIS*.

Através de análises de BLAST do gene *vicR* de *S. mutans*, identificamos uma proteína com alta similaridade (89% de similaridade) no genoma de *S. sanguinis* SK36 (Tabela 4). Os outros componentes do sistema VicRK (*vicK* e *vicX*) também foram identificados e análises comparativas dos genomas de *S. sanguinis* e *S. mutans* revelaram alta semelhança na organização genômica do locus vicRK, sugerindo conservação funcional (Figura 7).

Tabela 4 - Identidade e localização dos genes *vicR*, *vicK* e *vicX* e respectivas proteínas codificadas em *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* e seus homólogos identificados por análise de BLAST do genoma da cepa *Streptococcus sanguinis* SK36.

Espécie Bacteriana	Gene (tamanho, pb)	Número de Acesso (Gene ID)	Proteína (tamanho, aa)	Similaridade da sequência protéica ao homólogo de <i>S. mutans</i> (%)
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	<i>vicR</i> / SMU.1517 (1198 pb)	1028759	235 aa	-
	<i>vicK</i> / SMU.1516 (2275 pb)	1028760	450 aa	-
	<i>vicX</i> / SMU.1515 (1375 pb)	1028755	267 aa	-
<i>Streptococcus sanguinis</i> SK36	SSA_1565 (1184 pb)	4807118	233 aa	89%
	SSA_1564 (2250 pb)	4806426	449 aa	82%
	SSA_1563 (1388 pb)	4806266	266 aa	90%

Identidade dos genes e números de acesso foram identificados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)

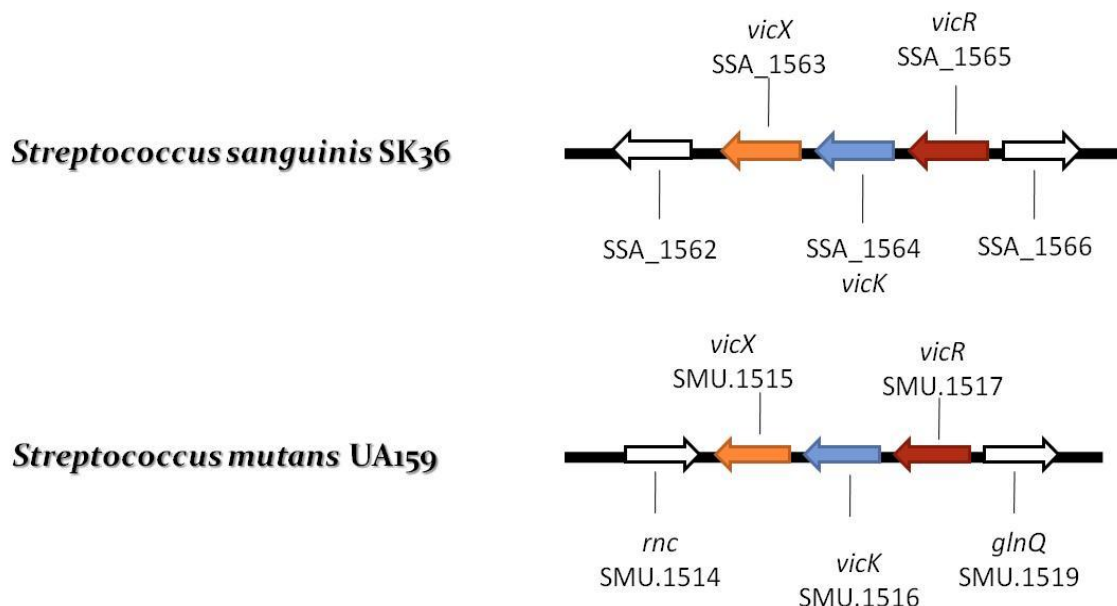


Figura 7 - Comparação da organização genômica dos genes *vicR*, *vicK* e *vicX* entre *S. mutans* UA159 e *S. sanguinis* SK36.

5.2. Construção do mutante *Streptococcus sanguinis* SK36 do gene *vicK* (SK*vicK*).

A Figura 8 ilustra as análises dos transformantes obtidos a partir da cepa *S. sanguinis* SK36 através de PCR de colônias, utilizando *primers* que flanqueiam o cassete de resistência à eritromicina (*erm^r*). Todos os transformantes demonstraram possuir produtos do gene *erm^r*.

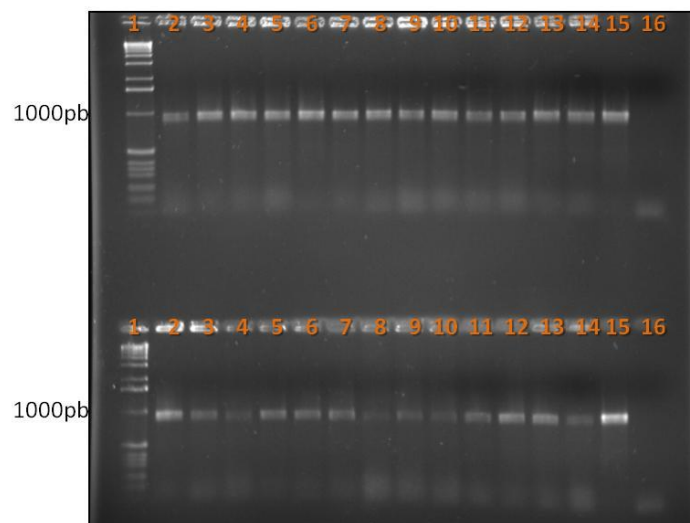


Figura 8 - Gel de agarose (2%) contendo os produtos de PCR obtidos com os *primers* E1/E2 (1000pb) nos transformantes em que o alelo de *vicK* contém o cassete de resistência à eritromicina. Canaleta 1 (nas fileiras superior e inferior): 0,9µg de padrão molecular 1kb (Invitrogen™, EUA). Canaletas 2 a 14 (superior e inferior): produtos de PCR a partir de 2 colônias da cepa recombinante SKvicK. Canaletas 15 (superior e inferior), controle positivo: pDNA (pVA838). Canaletas 16 (superior e inferior), controle negativo: água.

De um total de pelo menos 28 transformantes, quatro foram testados em outras reações de PCR utilizando outras combinações de *primers*, cujos produtos obtidos foram analisados em géis como ilustrado na Figura 9. Os *amplicons* obtidos através dos PCRs utilizando os *primers* P1/P4 (Figura 9B), P1/P2 e P3/P4 (Figura 9A), tendo como *template* o gDNA dos transformantes, revelaram a correta inserção do alelo mutado por recombinação homóloga. Dessa forma, obteve-se sucesso na construção do mutante *knockout vicK* em SK36, e essa cepa foi denominada, nessa tese, de SKvicK.

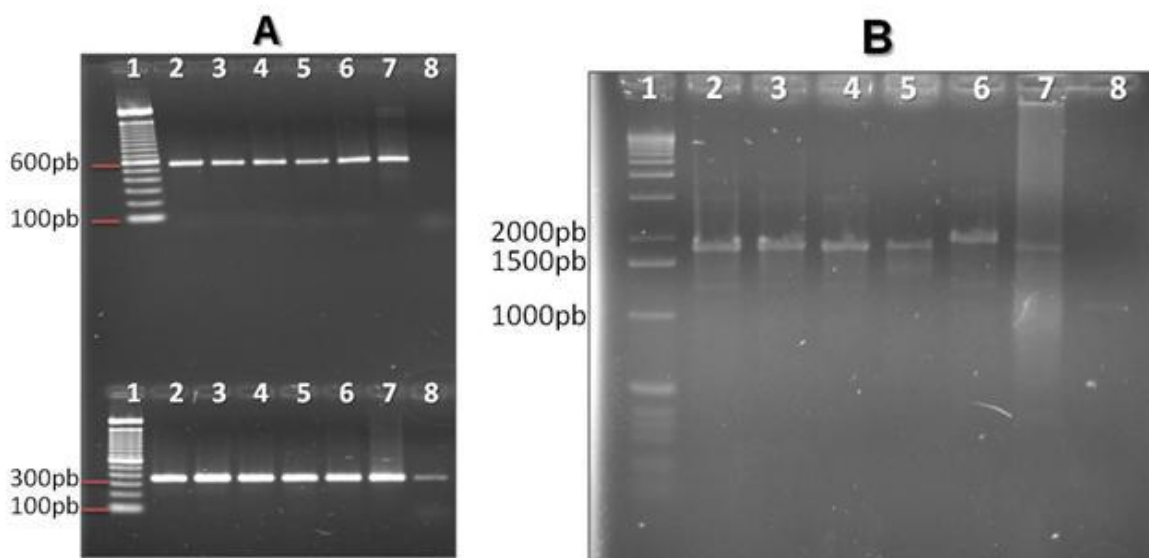


Figura 9 - Géis de agarose (1,5%) contendo de produtos de PCR obtidos utilizando diferentes *primers* (citados no parágrafo anterior), para verificar a correta inserção do alelo mutado *vicK* por recombinação homóloga. **Em A, parte superior:** *amplicons* gerados com *primers* P1/P2 (aprox. 554pb). Canaleta 1: padrão molecular 100pb (Invitrogen™, EUA). Canaletas 2 a 5: *amplicons* obtidos utilizando-se três amostras de mutantes SKvicK como *template*. Canaleta 6: *amplicon* obtido utilizando-se a cepa selvagem *S. sanguinis* SK36. Canaleta 7: *amplicon* obtido a partir do alelo recombinante P1-P4 purificado (construção). Canaleta 8: controle negativo (água). **Em A, parte inferior:** *amplicons* obtidos com *primers* P3/P4 (aprox. 341pb). Canaletas 2 a 5: *amplicons* gerados a partir de três amostras de mutantes SKvicK como *template*. Canaleta 6: *amplicon* gerado a partir da cepa selvagem *S. sanguinis* SK36. Canaleta 7: *amplicon* gerado a partir do alelo recombinante purificado P1-P4 (construção). Canaleta 8: controle negativo (água). **Em B:** *amplicons* gerados com *primers* P1/P4 (aprox. 1888pb). Canaleta 1: padrão molecular 1kb (Invitrogen™, EUA). Canaletas 2 a 5: *amplicons* obtidos a partir quatro amostras de mutantes SKvicK. Canaleta 6: *amplicon* obtido da cepa selvagem SK36. Canaleta 7: *amplicon* obtido a partir do fragmento P1-P4 purificado. Canaleta 8: controle negativo (água).

Diversos protocolos de transformação foram testados, utilizando-se diferentes tipos de DNA exógeno (plasmídeos auto-replicativos para *Streptococcus spp.* e fragmentos lineares com seqüências do genoma da cepa SK36) sem obtenção de transformantes da cepa *S. sanguinis* DSS-10. Análises fenotípicas da cepa DSS-10 realizadas neste projeto indicaram que DSS-10 difere de SK36, não apenas quanto ao fenótipo de competência, mas também quanto à

morfologia e tamanho das cadeias de cocos, tempo de geração, hidrofobicidade de superfície celular, assim como parece ser mais sensível ao estresse oxidativo (esse dado não consta na tese). Portanto, *S. sanguinis* DSS-10 não parece ser uma cepa representativa da espécie *S. sanguinis*, visto que a espécie *S. sanguinis* apresenta a característica de ser naturalmente competente, tal qual ocorre com a cepa SK36. A cepa *Streptococcus mutans* UA159 e respectiva mutante *vick* (UAvick) também foram incluídas, como controle, mediante o fato de já terem sido estudadas anteriormente pelo mesmo grupo de pesquisa. A construção de UAvick e diversas características fenotípicas de *S. mutans* UA159 e UAvick estão descritas em estudo anterior (Duque *et al.*, 2011) .

5.3. CRESCIMENTO PLANCTÔNICO E CARACTERÍSTICAS DAS CEPAS *S. SANGUINIS* SK36 E A MUTANTE *KNOCKOUT vick* (SKvick) EM AEROBIOSE, ANAEROBIOSE E MICROAEROFILIA.

Identificaram-se variações nas curvas representativas do crescimento planctônico entre as cepa WT SK36 e a mutante SKvick.

As Figuras 10, 11 e 12 demonstram o crescimento mais lento do mutante SKvick em comparação com a cepa ancestral SK36, tanto em aerobiose sob agitação (37°C; Incubadora “Shaker” – NT 712, Nova Técnica, Brasil; agitação com velocidade 80rpm), quanto quando as culturas foram incubadas em microaerofilia (37°C, 10%CO₂) e anaerobiose (10%H₂, 10%CO₂, 80%N₂). A diferença estatística do crescimento planctônico entre as cepas *S. sanguinis* SK36 e a respectiva *knockout vick* (SKvick) foi realizada com o auxílio do Teste T.

A cepa mutante SKvick exibe um fenótipo divergente da cepa WT SK36 quando se observa o crescimento planctônico de rotina, microaerofilia (37°C, 10%CO₂), *overnight* (18h), pois apesar das células de *S. sanguinis* normalmente precipitarem quando incubadas sem agitação, as células das cepas selvagens voltam à suspensão de forma uniforme após agitação em vórtex, enquanto que as

células da mutante SKvicK continuam a exibir um aspecto de “grumos” (Figura 13).

Para análise estatística, considerou-se o crescimento planctônico geral (2 a 8 horas), assim como as fases logarítmica (2 a 4 horas) e estacionária (6 a 8 horas).

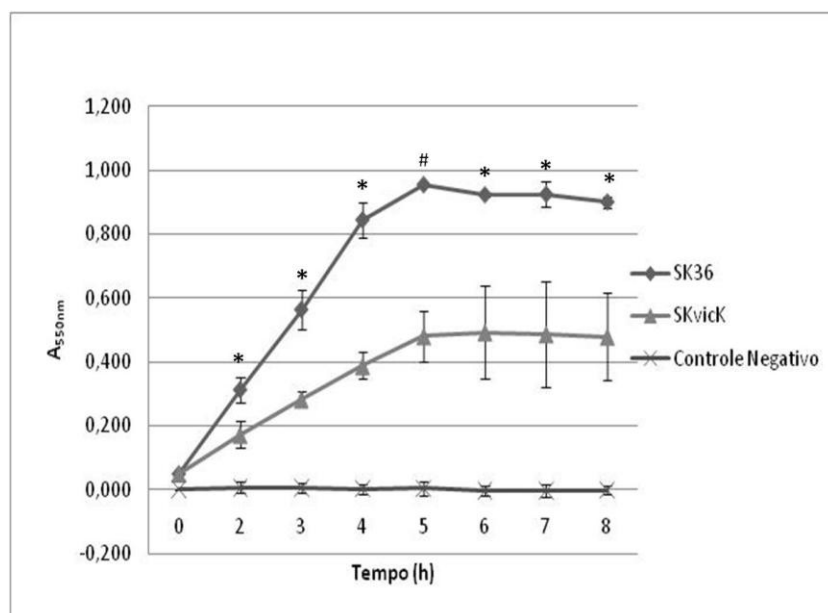


Figura 10 - Curvas de crescimento das cepas de *S. sanguinis* selvagens SK36 e a mutante SKvicK em aerobiose. Uma redução significativa do crescimento foi observada no mutante SKvicK em comparação com a cepa selvagem (SK36) (Teste T; * $p < 0,01$ nas três análises). As fases logarítmica e estacionária corresponderam, respectivamente, aos períodos de 2 a 4 e 6 a 8 horas de crescimento. Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes realizados em duplicata. #: ponto não analisado.

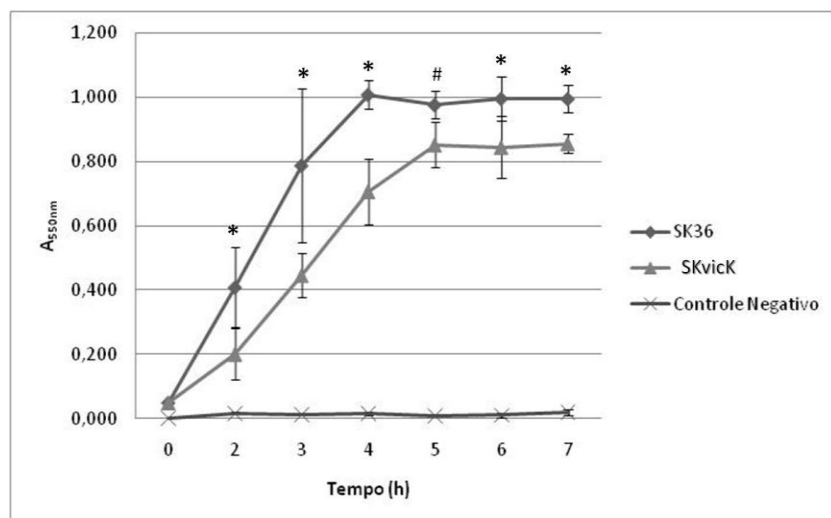


Figura 11 - Curva de crescimento das cepas de *S. sanguinis* SK36 e mutante SKvicK em anaerobiose (10% H_2 , 10% CO_2 , 80% N_2). Uma redução significativa do crescimento foi observada no mutante SKvicK em comparado à cepa selvagem (SK36), tanto no crescimento planctônico geral (Teste T; $p < 0,05$), quanto nas fases logarítmica (2 a 4 h de crescimento) e estacionária (6 e 7h de crescimento) (Teste T: * $p < 0,01$). Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes realizados em duplicata; as barras indicam os desvios padrão. #: ponto não analisado.

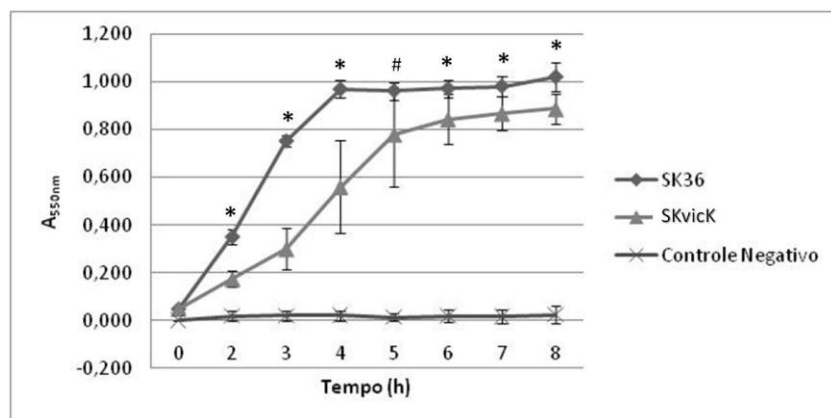


Figura 12 - Curva de crescimento das cepas *S. sanguinis* SK36 e a mutante *knockout* SKvicK em microaerofilia (37°C, 10% CO_2). Resultado significativo quando se compara o crescimento planctônico geral entre a cepa selvagem *S. sanguinis* SK36 e sua respectiva mutante *knockout* SKvicK (Teste T; $p < 0,01$), assim como essa diferença também foi significativa na fase logarítmica e estacionária do crescimento (Teste T; * $p < 0,01$). Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes realizados em duplicata. #: ponto não analisado.

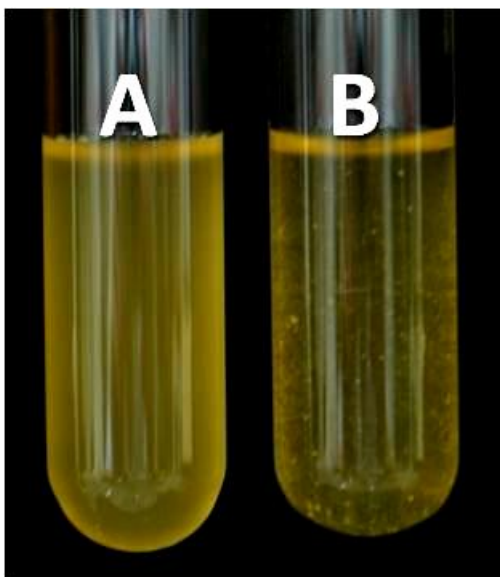


Figura 13 – Crescimento planctônico *overnight* em microaerofilia (37°C, 10%CO₂). Após agitação em vórtex, *S. sanguinis* SK36 (em A) voltou a ficar uniforme e SKvicK (em B) apresenta “grumos”.

5.4. *S. SANGUINIS* SK36 NECESSITA DE PROTEÍNAS SALIVARES PARA FORMAR BIOFILME, E A INATIVAÇÃO DE *vick* FOI CORRELACIONADO TANTO COM A AUSÊNCIA DE FORMAÇÃO DE BIOFILME QUANTO COM A PRESENÇA DE BIOFILMES DEFICIENTES EM EXPERIMENTOS DE BIOFILMES INICIAIS, 2 E 4H, EM PRESENÇA DE SALIVA.

5.4.1. *S. SANGUINIS* NECESSITA DE PROTEÍNAS SALIVARES PARA INICIAR A FORMAÇÃO DE BIOFILMES.

A capacidade de formação de biofilmes pelas cepas *S. sanguinis* foi analisada em condições que promovem grande formação de biofilmes por cepas de *S. mutans*.

Em um primeiro experimento, utilizaram-se placas de poliestireno, e meio THB acrescido de sacarose 0,2% e 1%, incubando as placas por 18h em microaerofilia (37°C, 10%CO₂). Em ambas as concentrações de sacarose citadas anteriormente, apenas a cepa *S. mutans* UA159 foi capaz de formar biofilmes robustos (Figuras 14).

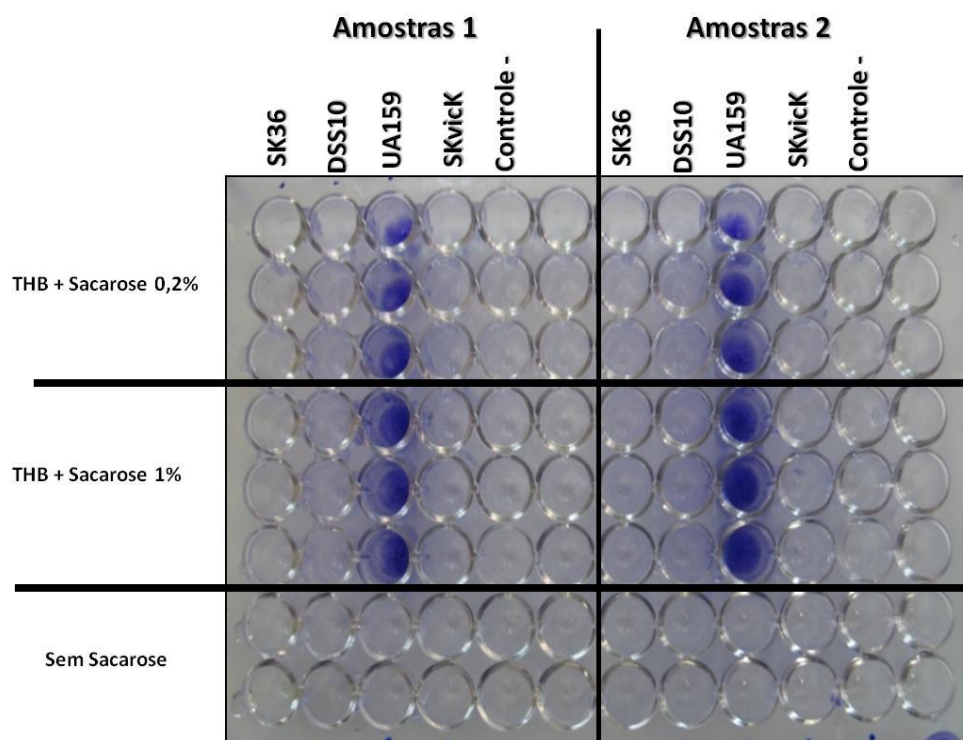


Figura 14 – Imagem de microplaca de poliestireno com 96 poços *round-bottom* (fundo em “U”), (placa de poliestireno nº. 650111, *round-bottom*, CralPlast, Brasil) incubada em microaerofilia (37°C, 10%CO₂) por 18h, evidenciando o biofilme formado pela cepa *S. mutans* UA159, e a ausência da formação de biofilme nas três cepas representativa da espécie *S. sanguinis* (as selvagens SK36 e DSS-10, e a mutante SKvicK). As amostras 1 e 2 equivalem a amostras independentes de cada cepa citada, apresentando três repetições em cada meio de cultura.

Na figura 15 (A e C), é possível notar que as maiores absorvâncias (A_{550nm}) foram da cepa selvagem *S. sanguinis* SK36, possivelmente porque essas células não foram capazes de formar biofilme, independente da quantidade de sacarose, ficando, dessa forma, em suspensão. Semelhante ocorreu com a cepa selvagem *S. sanguinis* DSS-10. Já a cepa *S. sanguinis* SKvicK apresentou uma baixa absorvância no crescimento planctônico (A_{550nm}) tanto quando utilizado THB acrescido de 0,2% de sacarose, quando se utilizou THB acrescido de 1% de sacarose. Interessantemente, a cepa mutante SKvicK apresenta a peculiar característica de precipitar quando se faz o seu crescimento de rotina em meio de

cultura líquido, por exemplo BHI caldo, retornando à suspensão quando agitada em vórtex, porém a mesma continua a apresentar aspecto de “grumo” (Figura 13).

Assim, cogita-se que a baixa absorbância apresentada pela cepa mutante SKvicK, deve-se ao fato de que as células estavam precipitadas quando da coleta da amostra para a leitura da absorbância, e essas células precipitadas foram perdidas durante os passos subseqüentes de lavagens com água destilada como parte do protocolo de processamento do biofilme, visto que elas estavam apenas precipitadas e não aderidas à placa. Nesse caso, uma amostra de 100µl foi retirada de cada poço e colocada numa microplaca de titulação *flat-bottom* (fundo chato) para realizar a leitura do crescimento planctônico, pois se acredita que esse seria o valor real do crescimento planctônico do experimento, visto que esse equivaleria à quantidade de células que não se aderiram para formar o biofilme.

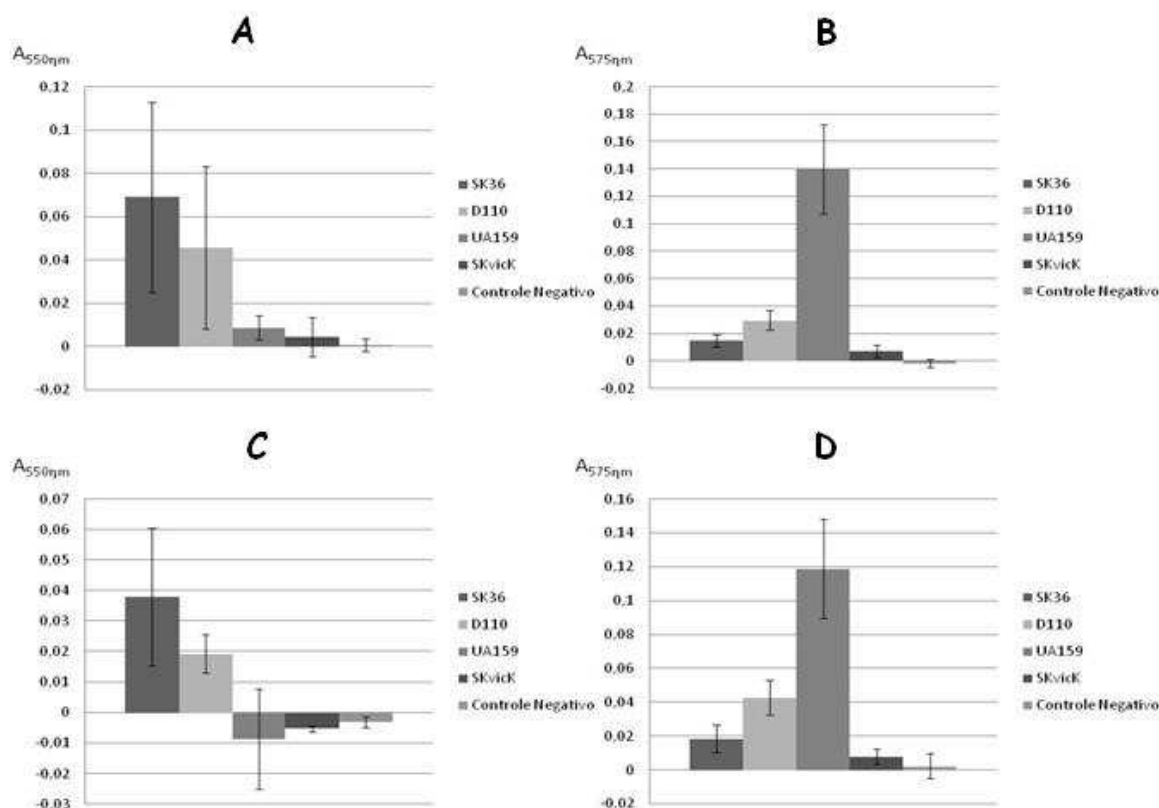


Figura 15 – Análise do crescimento plancônico (A_{550nm}) e em biofilmes (A_{575nm}) das cepas das espécies *S. sanguinis* SK36, DSS-10 e mutante SKvick e *Streptococcus mutans* UA159 em meio THB com 0,2% (A e B) ou 1,0% (C e D) de sacarose. As colunas representam as médias das medidas em triplicata de apenas um experimento (*experimento piloto*), e as barras, os desvios-padrão.

Uma vez que SK36 não foi capaz de formar biofilmes sob condições ideais de formação de biofilmes para a espécie *S. mutans*, foi realizado um *screening* para identificar outras condições para formação de biofilmes pela espécie *S. sanguinis*. Assim, diversas condições atmosféricas (aerobiose e anaerobiose), diferentes tipos de superfície (poliestireno ou polipropileno, com ou sem tratamento para adesão celular, CralPlast, Brasil e nº. 3799, Corning®, EUA, respectivamente), e diferentes meios de cultura (BHI, THB ou TSB – *Tryptic Soy Broth* - acrescidos de 1% de sacarose) foram testados. Em nenhuma destas condições se observou formação de biofilmes por SK36 ou SKvick, enquanto *S.*

mutans UA159 foi capaz de formar biofilmes de grande biomassa na maioria das condições testadas. Estes resultados indicam que as cepas selvagens *S. sanguinis* (SK36 e DSS-10) e mutante SKvicK diferem drasticamente das cepas *S. mutans* quanto ao fenótipo de crescimento em biofilmes nas condições experimentais testadas, sugerindo que *S. sanguinis* precisa de proteínas salivares para ser capaz de se aderir e, assim, iniciar a formação de biofilmes *in vitro*, uma vez que *S. sanguinis* é um colonizador primário das superfícies dentárias recobertas pela PA. Realizaram-se novos ensaios para comparar as etapas iniciais de crescimento em biofilmes (2 a 4h iniciais) na presença e ausência de saliva entre as espécies de *S. mutans* e *S. sanguinis*, assim como os respectivos mutantes *vicK*.

5.4.2. INATIVAÇÃO DE *VICK* ALTERA OS BIOFILMES INICIAIS DE *S. SANGUINIS* EM SUPERFÍCIES TRATADAS COM SALIVA.

Análises sobre os estágios iniciais de formação de biofilmes das cepas *S. mutans* e *S. sanguinis* indicaram grandes diferenças nos mecanismos de iniciação de biofilmes entre estas espécies.

Primeiro, *S. sanguinis* depende da presença de componentes salivares para iniciar biofilmes ainda que em presença de sacarose, enquanto que *S. mutans* parece formar biofilmes de forma mais eficiente em superfícies não tratadas com saliva. Segundo, *S. sanguinis* tem maior capacidade de formar biofilmes sob aerobiose quando se compara com os resultados em anaerobiose, completamente o oposto de *S. mutans* que forma biofilmes mais robustos nessa última condição atmosférica mencionada.

Embora estes dados indiquem mecanismos diferentes de iniciação de biofilmes entre estas espécies, o sistema VicRK parece regular funções importantes para o crescimento em biofilmes de ambas as espécies. A Figura 16, proveniente de imagens em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV, FOP/UNICAMP, Brasil), ilustra biofilmes de 2h formados sobre superfícies tratadas

com saliva humana, em aerobiose sob agitação, em que *S. sanguinis* SK36 foi capaz de iniciar uma camada homogênea de biofilme composto por diversas cadeias e diplococos, enquanto que o mutante SKvicK não conseguiu formar biofilme (Figura 16). Já nos ensaios de 4h, utilizando as mesmas condições de lamínulas e atmosfera, a cepa WT SK36 se comportou de forma semelhante ao que ocorreu no biofilme de 2h, porém a cepa mutante SKvicK, nesse caso, apresentou algumas poucas cadeias curtas e diplococos (Figura 17).

Em aerobiose, poucas cadeias foram observadas em biofilmes iniciais (2h) de *S. mutans* UA159 em presença de saliva, sendo que os biofilmes de UAvicK foram mais heterogêneos, uma vez que se restringiam agregados isolados de longas cadeias de cocos (Figura 16). Quanto aos biofilmes de 4h, *S. mutans* UA159 apresentou um aumento substancial na quantidade de cadeias e já é possível ver a formação de biofilmes propriamente ditos, enquanto o respectivo mutante *vick* continuou a apresentar o mesmo aspecto de agregados, só que maiores que os observados no biofilme de 2h (Figura 17).

S. sanguinis SK36 não foi capaz de iniciar biofilmes nas lamínulas sem tratamento prévio com saliva, em aerobiose sob agitação, tanto nos biofilmes iniciais de 2h quanto o de 4h. Assim, ressalta-se a importância de proteínas salivares para a aderência inicial de *S. sanguinis* e posterior colonização. *S. sanguinis* SKvicK não conseguiu formar biofilme inicial (2h e 4h) em lamínulas sem tratamento com saliva, e, dessa forma, verifica-se que, em *S. sanguinis*, a inativação de *vick* inibe a formação de biofilmes (Figuras 16 e 17). Interessante observar que *S. mutans* apresentou uma melhor formação de biofilmes em lamínulas sem tratamento prévio com saliva, caracterizando-se por microcolônias e cadeias aparentemente envoltas por matriz extracelular (2h) e um biofilme mais robusto e com maior quantidade de matriz (4h). Nos biofilmes de UAvicK, em aerobiose, utilizando lamínulas sem tratamento com saliva, observou-se aspecto semelhante ao observado nas lamínulas com tratamento prévio de saliva tanto nos ensaios de 2h quanto nos de 4h (Figuras 16 e 17).

Em anaerobiose, no biofilme inicial de 2h, as cepas *S. sanguinis* SK36 e a sua respectiva mutante SKvicK apresentaram fenótipo semelhante de formação de biofilmes, em lamínulas com tratamento de saliva, com cadeias semelhantemente curtas e espaçadas, diferindo apenas na quantidade, sendo a mesma reduzida em SKvicK. O fenótipo se manteve semelhante nos biofilmes de 4h, apenas apresentando uma maior quantidade de células na cepa SK36 (Figuras 16 e 17). Já a estrutura dos biofilmes iniciais (2h) de *S. mutans* UA159 diferiu claramente da sua respectiva mutante, UAvicK, visto que essa última apresentou cadeias muito longas e uma grande formação de agregados, aumentando a quantidade, em ambos, de forma considerável quando incubados por 4h (Figuras 16 e 17).

Quanto à análise dos biofilmes iniciais de 2h e 4h, em lamínulas sem tratamento com saliva, as cepas *S. sanguinis* não foram capazes de formar biofilmes na ausência de saliva, enfatizando que, também em anaerobiose, as proteínas salivares são realmente importantes para a formação do biofilme inicial por essa espécie (Figuras 16 e 17). Já *S. mutans* UA159 e a respectiva mutante UAvicK em lamínulas sem tratamento com saliva e em anaerobiose, tanto em 2h quanto em 4h, nota-se que a estrutura dos biofilmes da cepa selvagem difere claramente da respectiva mutante, pois essa continua a apresentar aspecto de agregado de cadeias muito longas, enquanto que a cepa WT UA159, apresenta uma quantidade de células muito superior que os ensaios em aerobiose, e essas, encontram-se em cadeias e envoltas por uma matriz extracelular (2h), e aumentando consideravelmente nos ensaios de 4h (Figura 17).

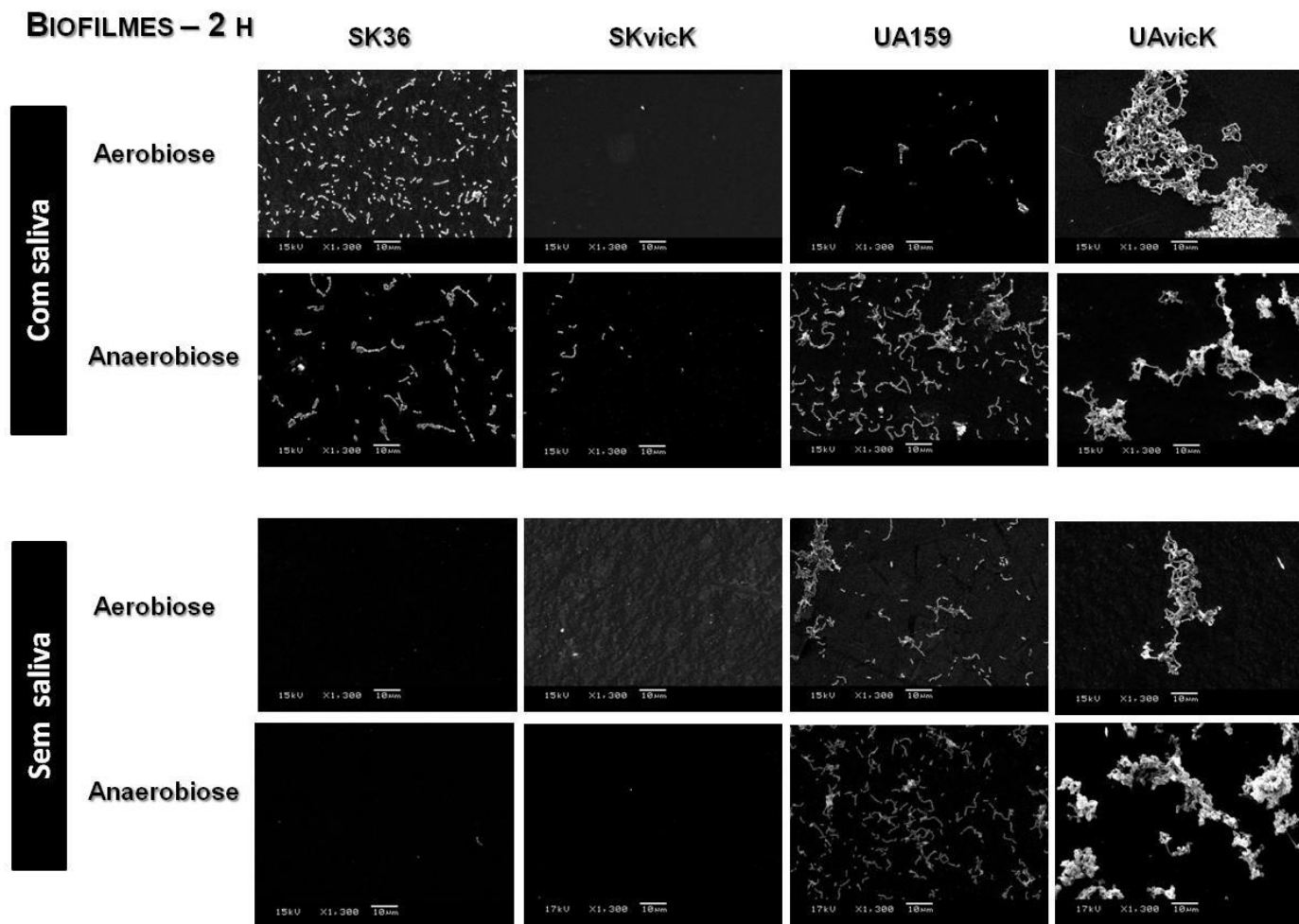


Figura 16 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes iniciais (2h) formados pelas cepas *S. sanguinis* SK36 e a respectiva mutante SKvicK, e *S. mutans* UA159 e UAvicK, em lamínulas de vidro com/sem tratamento prévio com saliva humana, sob aerobiose (agitação em shaker com velocidade 80) e anaerobiose (10% H_2 , 10% CO_2 , 80% N_2). As imagens são representativas de 32 campos analisados em cada lamínula (MEV – FOP/UNICAMP).

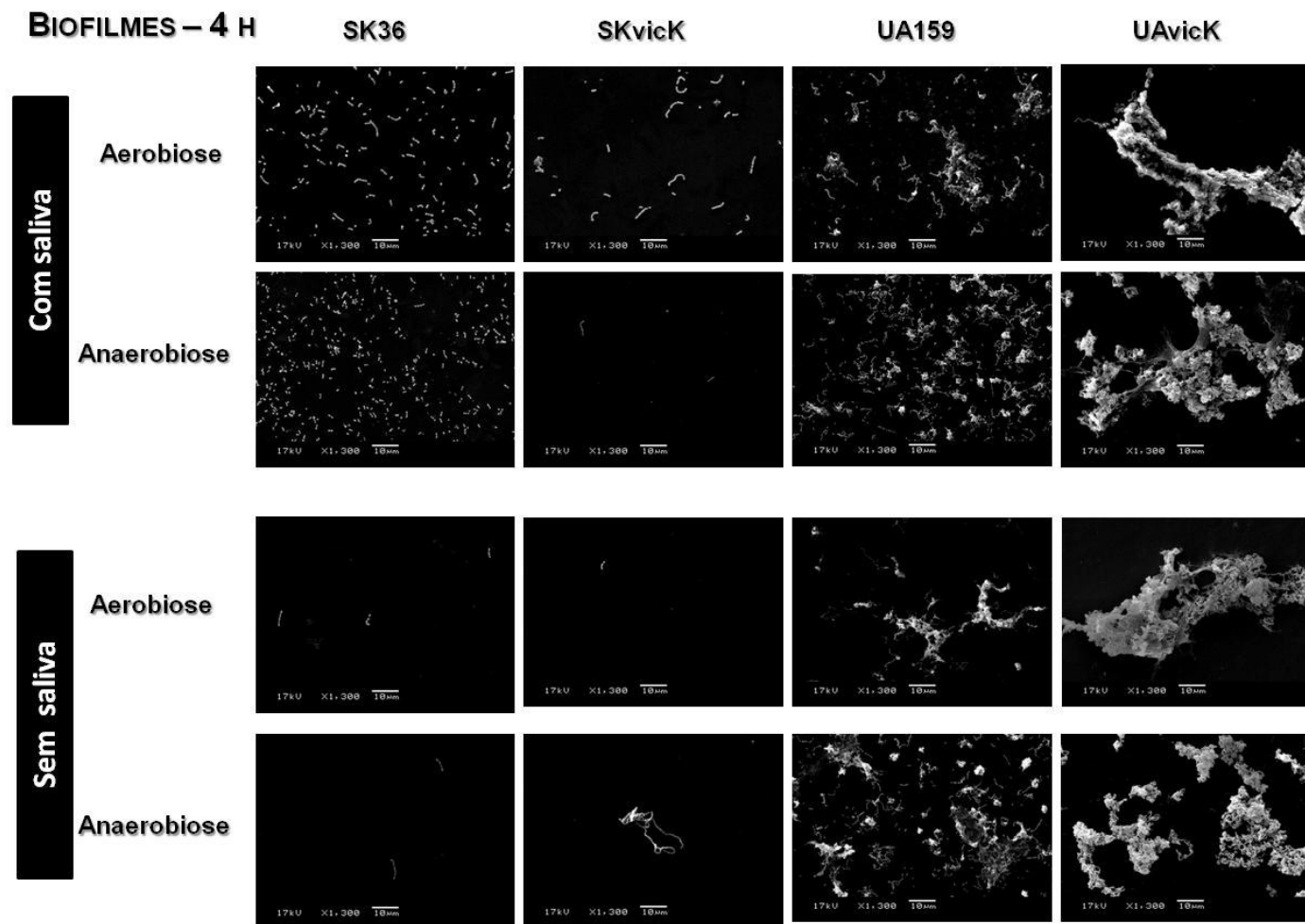


Figura 17 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes iniciais (4h) formados pelas cepas *S. sanguinis* SK36 e a respectiva mutante SKvicK, e *S. mutans* UA159 e UAvicK, em lamínulas de vidro com/sem tratamento prévio com saliva humana, sob aerobiose (agitação em shaker com velocidade 80) e anaerobiose (10% H_2 , 10% CO_2 , 80% N_2). As imagens são representativas de 32 campos analisados em cada lamínula (MEV – FOP/UNICAMP).

5.5. INATIVAÇÃO DE *vick* ALTERA A MORFOLOGIA DE *S. SANGUINIS*

Análises da morfologia por MEV indicaram que a inativação de *vick* em *S. sanguinis* SK36 promoveu um grande aumento das cadeias de cocos na cepa mutante SKvicK, as quais tendem a formar grandes grumos compactos e desprovidos de matriz extracelular, mesmo se cultivadas na presença de 0,1% de sacarose.

Imagens representativas do crescimento planctônico das cepas WT *S. sanguinis* SK36 e DSS-10 e a mutante *knockout* SKvicK, em anaerobiose (10% H_2 , 10% CO_2 , 80% N_2) mostram que as cepas SK36 e DSS-10 apresentam, geralmente, uma grande quantidade de cocos isolados, diplococos e cadeias relativamente curtas, sendo, essas últimas, mais presentes na DSS-10 (Figura 18). Já a mutante SKvicK apresenta a forma de longas cadeias, além de demonstrar o aspecto de grandes grumos, já citado no parágrafo anterior, e essa cepa apresenta esse aspecto de agregados quando em crescimento planctônico em qualquer condição atmosférica (Figura 13), especialmente quando em aerobiose sob agitação.

Na Figura 19, apresentamos imagens representativas do crescimento planctônico da cepa WT SK36 e a sua respectiva mutante *vick* em aerobiose sob agitação. Em aerobiose, *S. sanguinis* SK36 apresenta uma maior quantidade de cadeias relativamente longas, mas nada que se compare ao tamanho das cadeias de SKvicK, além do fato dessa última, continuar a apresentar o aspecto de formação de grumos, agregados compactos.

Sabemos que, morfológicamente, a cepa *S. mutans* UA159 difere da cepa *S. sanguinis* SK36 quanto ao tamanho das células, sendo essas mais alongadas na primeira espécie citada. Mas, é interessante observar que a inativação de *vick* em ambas as espécies selvagens faz com que as cepas mutantes tenham características similares (Figura 20), como: células curtas, um diferencial especial para a cepa UAvicK, visto que é totalmente discrepante da morfologia da sua respectiva cepa WT; cadeias extremamente longas; e

possuírem o aspecto de formação de grumos em crescimento planctônico em meio de cultura líquido, porém, na mutante UAvicK, esse aspecto é perdido quando se agita o meio de cultura, o que não ocorre na cepa mutante SKvicK.

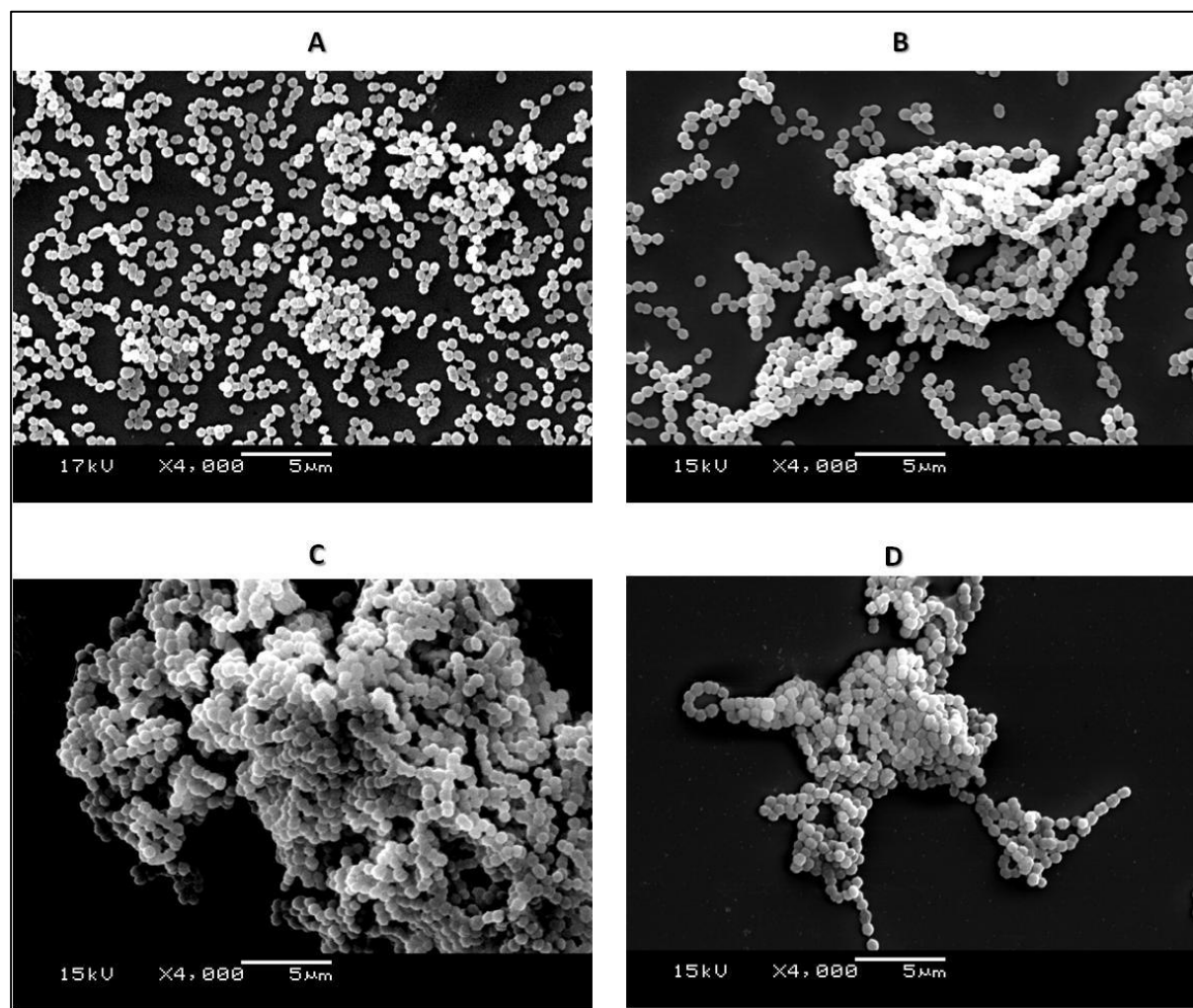


Figura 18 – Análise de microscopia eletrônica de varredura da morfologia de células em crescimento planctônico das cepas *S. sanguinis* SK36 (em A), *S. sanguinis* DSS-10 (em B) e a mutante SKvicK (em C e D). As cepas foram crescidas em meio BHI, em anaerobiose (10% H_2 , 10% CO_2 , 80% N_2) (MEV – FOP/UNICAMP).

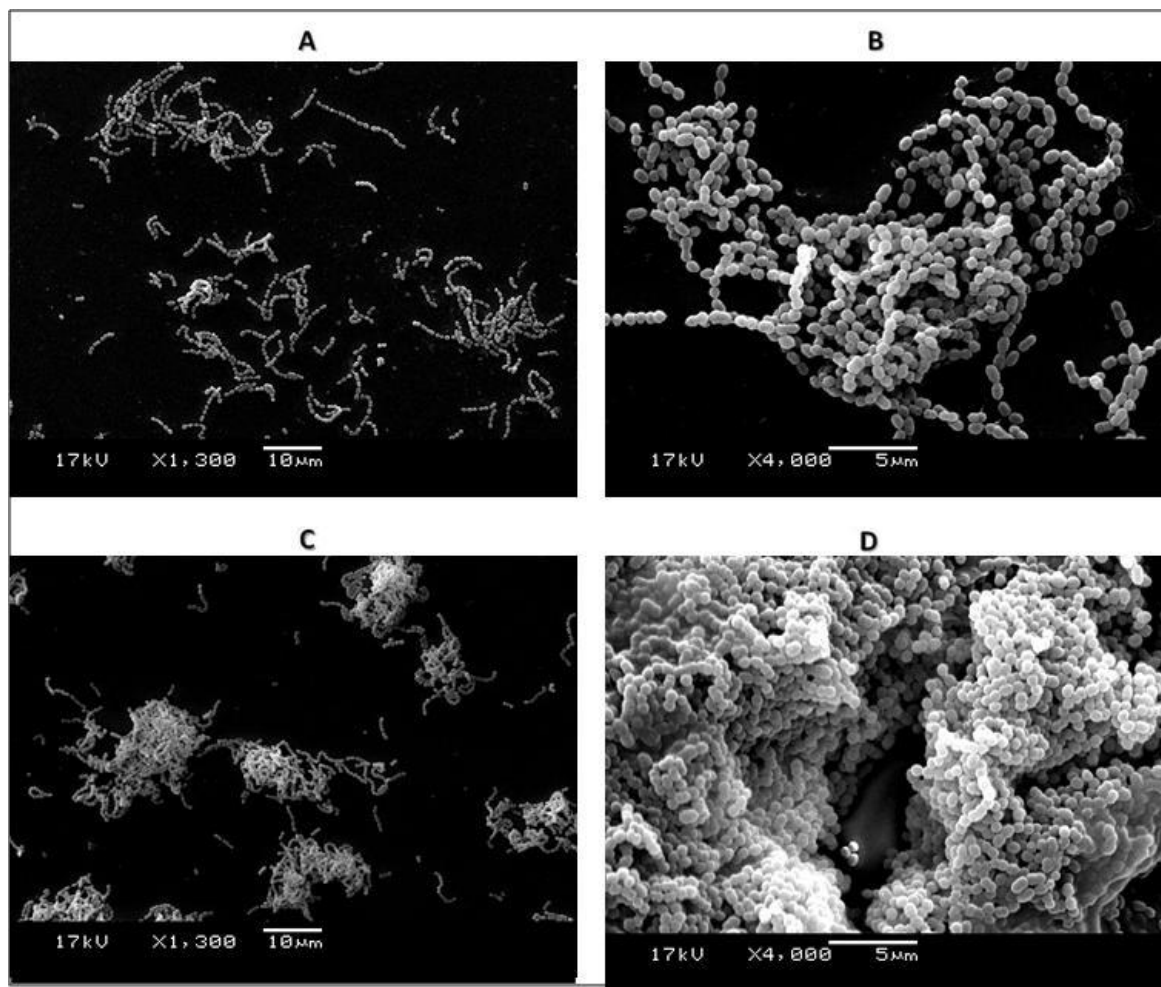


Figura 19 – Análise de microscopia eletrônica de varredura da morfologia bacteriana em crescimento planctônico das cepas *S. sanguinis* SK36 (A, B) e mutante SKvick (C e D). As cepas foram crescidas em meio BHI, em aerobiose, sob agitação. Diferente de SK36, a mutante SKvick formou grandes agregados celulares formados com cadeias extremamente longas (MEV – FOP/UNICAMP).

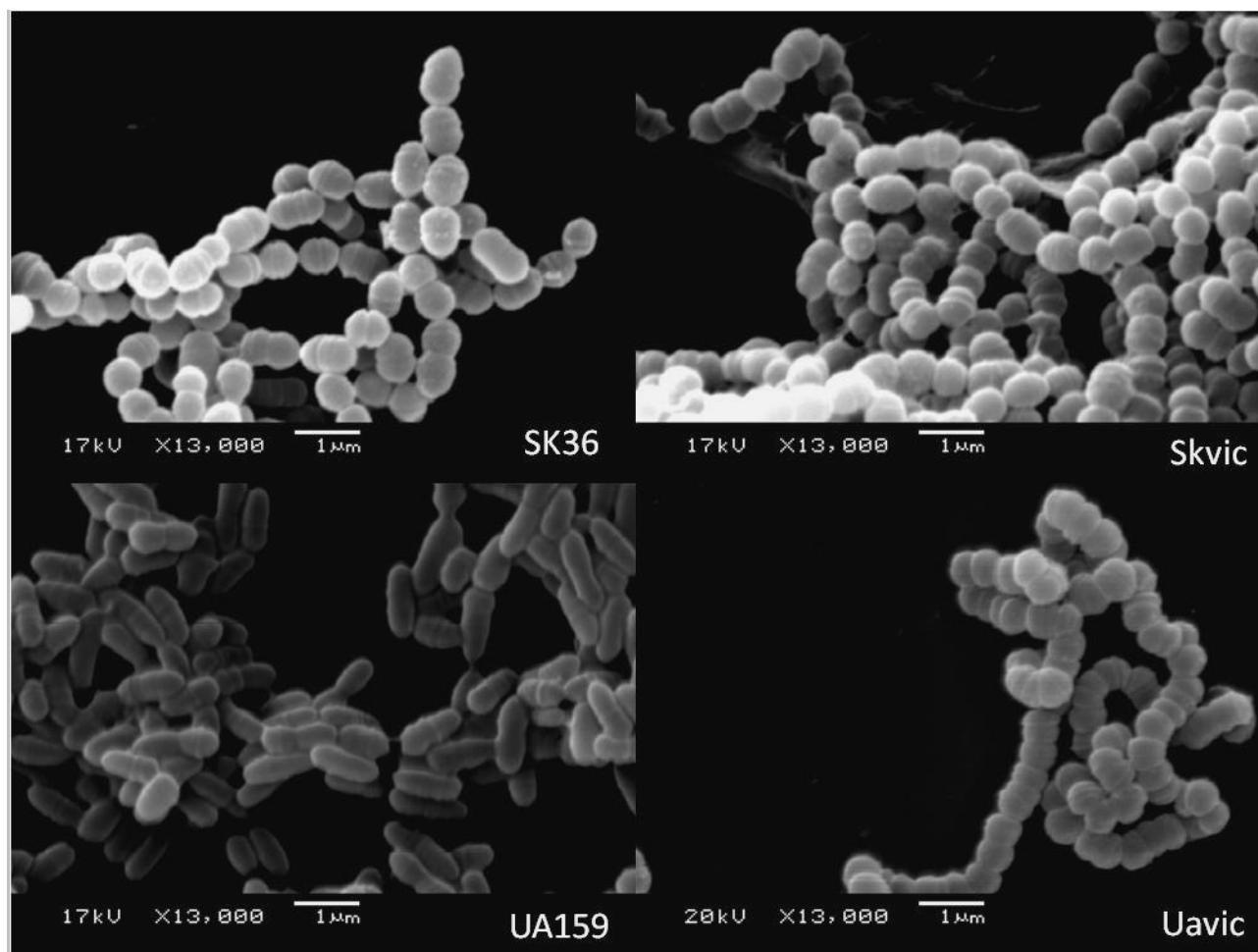


Figura 20 – Análise de microscopia eletrônica de varredura de bactérias em crescimento planctônico em meio BHI e em aerobiose, sob agitação. Cepas *S. sanguinis* SK36 e SKvicK, e *S. mutans* UA159 e UAvicK. Diferente de SK36, a cepa *S. mutans* UA159 forma cocos mais alongados. Ambos os mutantes, SKvicK e UAvicK, demonstram células curtas e cadeias extremamente longas (MEV – FOP/UNICAMP).

5.6. INATIVAÇÃO DE *vick* AUMENTA A HIDROFOBICIDADE CELULAR DE *S. SANGUINIS*.

As cepas *S. sanguinis* são, naturalmente, mais hidrofóbicas que as de *S. mutans*. Duque *et al.* (2011) observou que a inativação de *vick* em *S. mutans* UA159 promove aumento significativo na hidrofobicidade sob condições de 10%CO₂, já em *S. sanguinis*, essa inativação também promoveu aumento da hidrofobicidade, mas este aumento foi modesto em comparação com a espécie *S. mutans*, em virtude de *S. sanguinis* SK36 ser muito mais hidrofóbica que *S. mutans* UA159.

Apesar de pequenas, diferenças estatisticamente significantes entre SK36 e SK_{vick} foram detectadas sob condições de anaerobiose (ANOVA, Tukey; $p < 0,01$) e 10%CO₂ (ANOVA, Tukey; $p < 0,05$), não sendo observadas diferenças significativas nos ensaios de aerobiose (sob agitação). A inativação de *vick* em *S. mutans* UA159, promoveu aumento significativo na hidrofobicidade sob todas as condições atmosféricas testadas (ANOVA, Tukey; $p < 0,01$) (Figura 21).

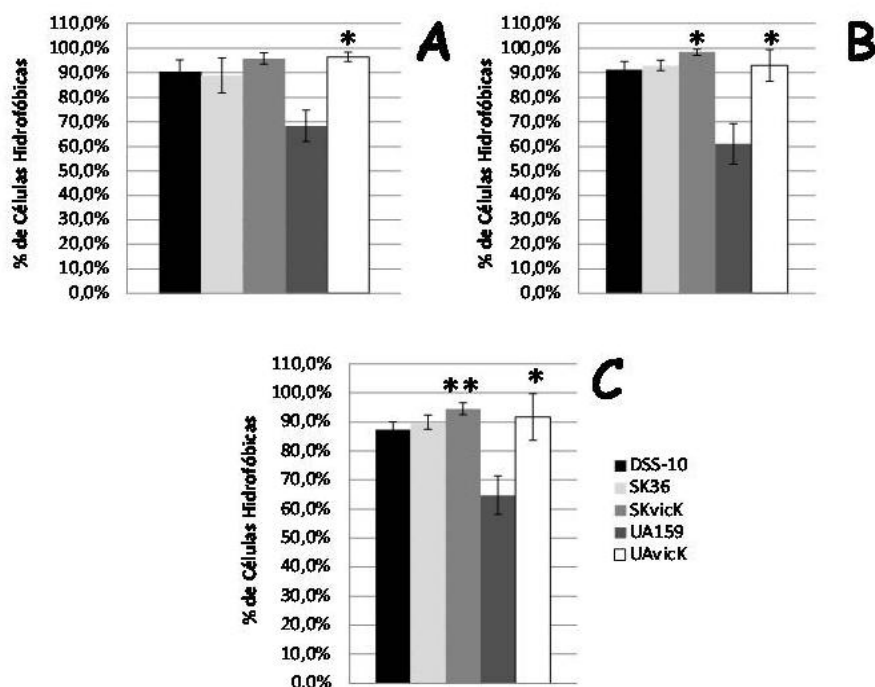


Figura 21 - Hidrofobicidade das cepas da espécie *S. sanguinis* SK36, DSS-10 e mutante SKvicK, e da espécie *S. mutans* UA159 e mutante UAvicK crescida em aerobiose (A), anaerobiose (B) e 10%CO₂ (C). As colunas representam as médias de três experimentos independentes realizados em duplicata. As barras indicam os desvios-padrão. Comparações entre as cepas selvagens e respectivos mutantes *vicK* indicam diferenças significativas (ANOVA; Teste de Tukey; *p<0,01; **p<0,05).

5.7. A INATIVAÇÃO DE *VICK* EM *S. SANGUINIS* SK36 PROMOVE PEQUENA DIMINUIÇÃO NA ATIVIDADE AUTOLÍTICA.

A atividade autolítica das cepas estudadas pode ser observada na Figura 22, em que as cepas selvagens de *S. sanguinis*, SK36 e DSS-10, são mais resistentes à autólise que a cepa *S. mutans* UA159. Em UA159, a inativação de *vicK* (UAvicK) aumentou significativamente a resistência à autólise. Houve

tendência de aumento da atividade autolítica em SKvicK em comparação com SK36, mas este aumento foi menos significativo comparado às cepas *S. mutans*. A cepa mutante SKvicK mostrou-se significativamente mais resistente à autólise em relação à selvagem apenas nas primeiras 24h de incubação (Kruskal- Wallis, $p<0,05$) (Figura 22A). Quanto ao ensaio em 10%CO₂, não houve diferenças significativas entre as cepas *S. sanguinis* SK36 e sua respectiva mutante *vicK* (Figura 22B). *S. mutans* apresentou resultado idêntico ao visualizado em aerobiose (Kruskal-Wallis; $p<0,01$).

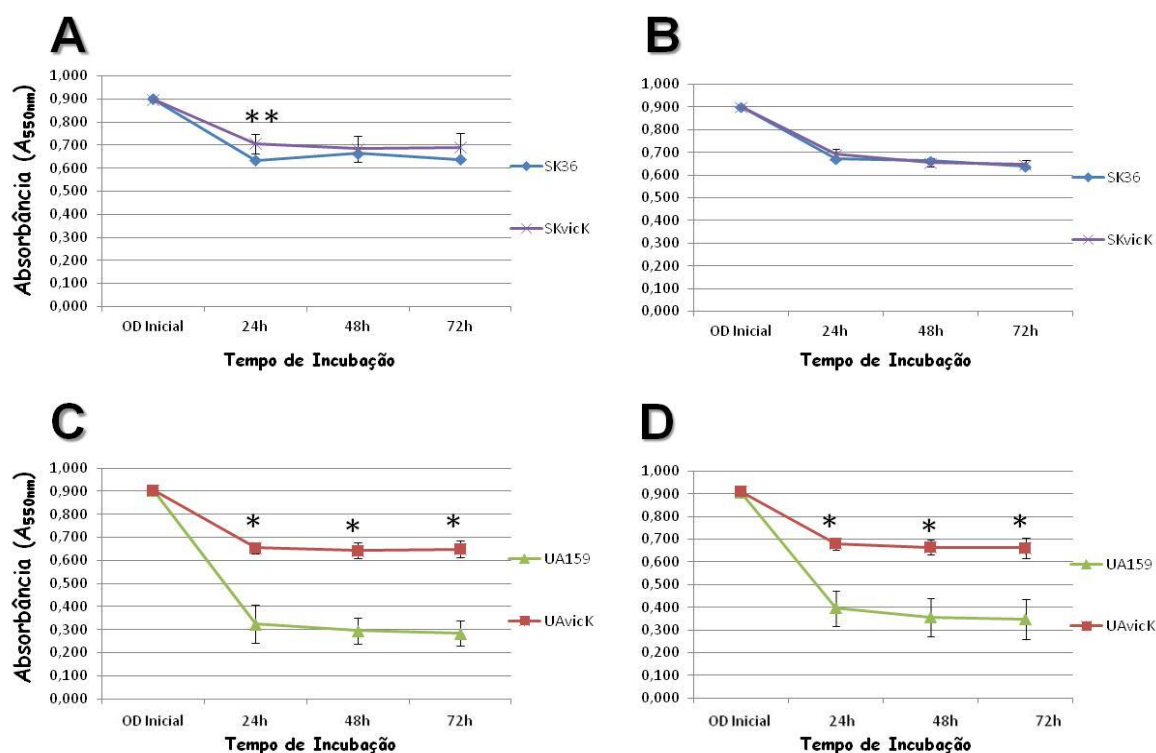


Figura 22 – Atividade autolítica das cepas de *S. sanguinis* SK36 e SKvicK (A,B) e de *S. mutans* UA159 e UAvicK (C,D), durante incubação da 44°C, sob condições de aerobiose (A,C) e 10% CO₂ (B,D). Os pontos representam médias de três experimentos independentes realizados em duplicata. As barras indicam os desvios-padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes entre SK36 ou UA159 e respectivas cepas mutantes (Kruskal-Wallis: * $p<0,01$, ** $p<0,05$.)

5.8. INATIVAÇÃO DE *vick* EM *S. SANGUINIS* AUMENTA A SENSIBILIDADE AO ESTRESSE OXIDATIVO SOB CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE.

As reduções da viabilidade de cada cepa, após a exposição ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em comparação com as mesmas cepas não expostas, estão representadas na Figura 23. Em aerobiose, a inativação de *vick* em *S. mutans* UA159 promoveu aumento significativo da sensibilidade a H_2O_2 , com uma redução média de 8 vezes no *log* de ufc/ml em UAvick, enquanto com uma redução menor (5 vezes no *log* ufc/ml) em UA159, a qual não foi estatisticamente significativa. Sob a mesma condição atmosférica, não se observou diferença entre as reduções *log* ufc/ml entre as cepas *S. sanguinis* SK36 e sua respectiva mutante *vick* (Figura 23A).

Por outro lado, em anaerobiose, a inativação de *vick* em *S. sanguinis* (SKvick) promoveu maior redução na viabilidade, quando comparada à cepa SK36 (ANOVA; Tukey: $p < 0,05$). O mesmo não foi observado em UAvick, comparado à cepa *S. mutans* UA159, uma vez que estas cepas sofreram uma redução de cerca de 3 e 4 vezes no *log* de ufc/ml, respectivamente (Figura 23B).

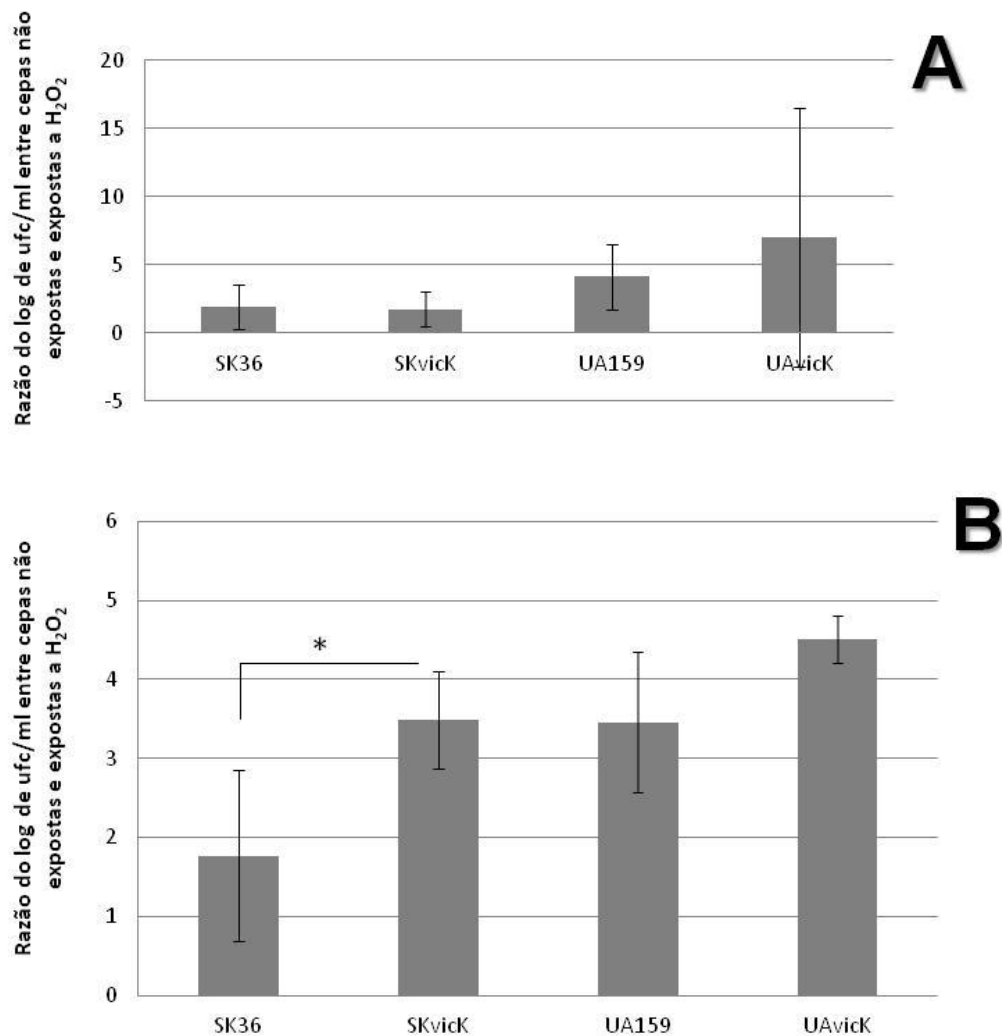


Figura 23 – Reduções no *log* de ufc/ml das cepas expostas a H_2O_2 em relação ao controle sem estresse oxidativo em aerobiose (A) e anaerobiose (B). Ensaio realizado com as cepas selvagens *S. sanguinis* SK36 e *S. mutans* UA159, e respectivas mutantes SKvicK e UAvicK. As colunas indicam médias de três experimentos independentes realizados em duplicata. As barras indicam os desvios padrão. Reduções da viabilidade de SKvicK foram maiores quando comparadas às reduções de viabilidade de SK36 em anaerobiose (ANOVA, Tukey ** $p < 0,05$).

5.9. O SISTEMA VicRK REGULA A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À VIRULÊNCIA EM *S. SANGUINIS*, RESPONSÁVEIS PELA ADESÃO, FORMAÇÃO DE BIOFILMES, E COMPETITIVIDADE COM OUTROS MICRORGANISMOS.

O sistema VicRK regula genes de virulência em espécies do gênero *Streptococcus*, como *S. mutans* e *S. pneumoniae*, relacionados à biogênese do envelope celular, formação de biofilmes e resposta ao estresse oxidativo. Investigamos, portanto, o efeito da inativação de *vicK* em *S. sanguinis*, na expressão dos ortólogos destes genes que compõem o regulon de VicRK em *S. mutans* e/ou *S. pneumoniae*, como *ssapcsB*, *lysM*, *cwdP*, *pmC* e de genes de *S. sanguinis* previamente caracterizados como importantes para a colonização bucal.

5.9.1. Extração de RNA e RT-PCR

Um total de 24 amostras foi utilizado para extrair o RNA total. Essas amostras equivalem às culturas celulares das cepas *S. sanguinis* SK36 e a respectiva mutante SKvicK, nas fases *mid-log* e *late-log*, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose.

Os RNAs foram extraídos e tratados com 10U de *Turbo DNase* (Ambion, EUA) conforme a seção 4.13.1. (Figura 24), para eliminar traços de gDNA que ainda possam estar na amostra. E, através de reações de RT-PCR, obteve-se os respectivos cDNAs para realizar as reações de qPCR.

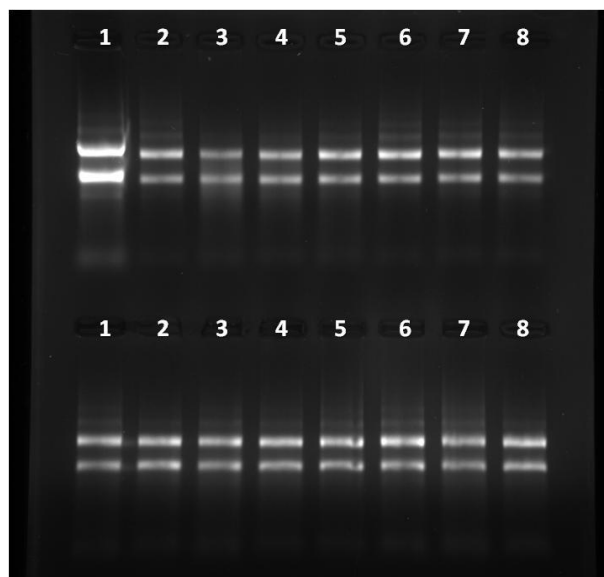


Figura 24 – RNAs extraído e tratados com Turbo DNase. Amostras de RNA extraído (canaleta 1; superior) e de RNAs tratados com Turbo DNase (Ambion, EUA), para se eliminar traços de gDNA (canaletas 2 a 8 – superior; canaletas 1 a 8 – inferior).

5.9.2. INATIVAÇÃO DE *vick* REDUZ A EXPRESSÃO DE POSSÍVEIS GENES CODIFICADORES DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *S. SANGUINIS*, ESPECIALMENTE NA FASE MID-LOG DA AEROBIOSE.

As alterações nas quantidades relativas de transcritos de diversos genes investigados em SKvicK em relação à cepa selvagem estão ilustradas na Figura 25. O gene *lysM* sofreu reduções significativas no mutante SKvicK em todas as condições atmosféricas e fases de crescimento testadas. A maior redução (23,8 vezes, $p < 0,01$) ocorreu sob aerobiose, em células no meio da fase logarítmica de crescimento. Também sob aerobiose, os genes que sofreram reduções significativas na expressão ($p < 0,01$) no mutante em fase logarítmica intermediária foram *ssapcsB* (6,4 vezes), *cwdP* (8,8 vezes), *spxB* e *comE* (2,8 vezes cada). Alterações destes mesmos genes não foram notadas ao final da fase *log*.

Sob condições de anaerobiose, as alterações na expressão gênica foram menores. Assim, os genes *ssapcsB* e *lysM*, foram os únicos com expressão significativamente reduzida (1,9 e 12 vezes respectivamente) durante a fase logarítmica intermediária. Ao final da fase *log*, *lysM* manteve a expressão reduzida em 12 vezes em relação à cepa selvagem e *cwdP* também demonstrou redução de 4,9 vezes (Figura 25).

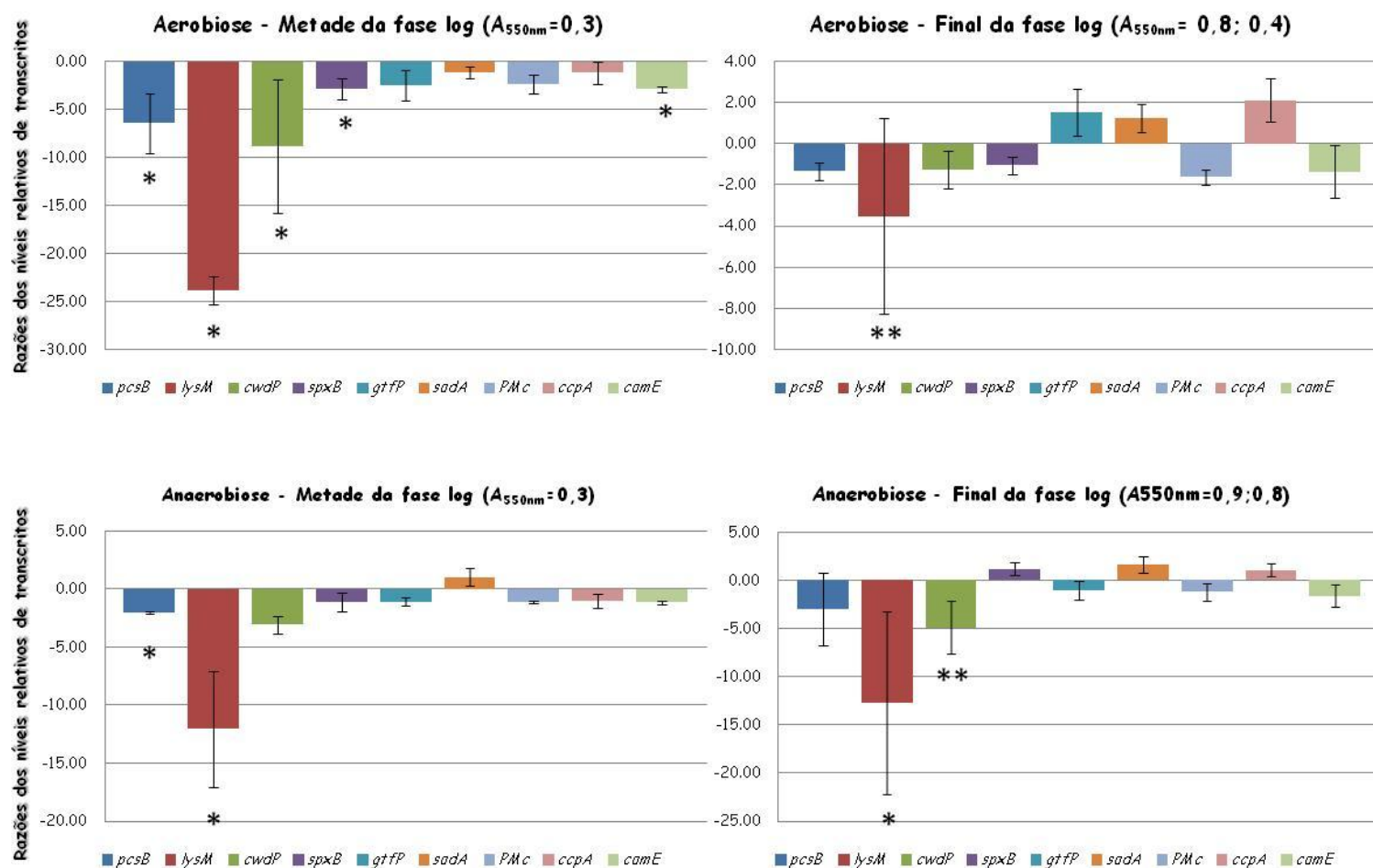


Figura 25 – Alterações nas quantidades de transcritos de diversos genes no mutante SKvicK em relação à cepa selvagem Sk36, em diferentes fases de crescimento planctônico em aerobiose (A, B) ou anaerobiose (C,D). Os níveis de transcritos de cada gene foram normalizados pelo gene 16SrRNA. A fase de crescimento planctônico é indicada sobre cada gráfico. Diferenças significativas na expressão gênica em relação à cepa selvagem foram detectadas utilizando-se o *software* REST 2009 (Qiagen): * $p<0,01$, ** $p<0,05$.

6. DISCUSSÃO

Streptococcus sanguinis são os principais colonizadores primários dos biofilmes dentários. Esta espécie tem papel importante no estabelecimento da microbiota dos dentes, pois é encontrada em alta proporção nas etapas iniciais de formação do biofilme, juntamente com outras espécies de *Streptococcus* comensais. Cerca de 80% dos colonizadores iniciais dos dentes são do gênero *Streptococcus* (Rosan & Lamont, 2000). Há ainda diversas evidências de que *S. sanguinis* é um competidor do principal patógeno da cárie dentária, *Streptococcus mutans* (Ge *et al.*, 2008a), sendo esta última uma espécie que normalmente se estabelece em biofilmes já iniciados e sob condições ambientais que aumentam sua competitividade, como o consumo de sacarose (Ahn & Burne, 2007).

Na espécie *S. mutans*, o sistema regulador VicRK regula positivamente a expressão de diversos fatores de virulência na formação de biofilmes dependentes de sacarose, os quais incluem os genes *gtfB/C* e *gbpB*. Os genes *gtfB/C* codificam respectivamente, as enzimas glicosiltransferases GtfB e GtfC, responsáveis pela síntese de glucano a partir da sacarose. O gene *gbpB* codifica a proteína extracelular GbpB, importante para a interação de *S. mutans* com a matriz extracelular (Senadheera *et al.*, 2005; Mattos-Graner, 2006; Duque *et al.*, 2011). Este é o primeiro estudo do conhecimento deste grupo de pesquisa que identifica e caracteriza o sistema VicRK em *S. sanguinis*. Embora o sistema VicRK esteja presente em ambas as espécies *S. mutans* e *S. sanguinis* SK36 (Tabela 4; Figura 7), observaram-se diferenças na função de VicRK entre as duas espécies.

Neste estudo, demonstrou-se sucesso na obtenção do mutante do gene *vick* a partir da cepa *S. sanguinis* SK36, cujo genoma tornou-se conhecido a partir do trabalho de Xu *et al.* (2007). Curiosamente, não foi possível obter mutantes a partir da cepa *S. sanguinis* DSS-10, uma vez que esta cepa não expressou fenótipo de competência mediante os protocolos utilizados (Perry & Kuramitsu, 1981; Wang *et al.*, 2002). Outras diferenças foram observadas entre as cepas *S. sanguinis* SK36 e DSS-10, como por exemplo, variações significativas no padrão

de crescimento planctônico em diversas condições biofísicas e na observação da morfologia celular com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) (FOP-UNICAMP) (Figura 18B). A discussão pretende demonstrar os diversos efeitos da inativação de VicRK na biologia de *S. sanguinis*, comparando-os com a espécie *S. mutans*.

6.1. *S. SANGUINIS* NECESSITA DE COMPONENTES SALIVARES PARA FORMAR BIOFILMES, O QUE POSSIVELMENTE ENVOLVE DIVERSAS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE REGULADAS PELO SISTEMA VicRK.

Diferente de *S. mutans*, *S. sanguinis* apresenta pobre capacidade de crescimento em biofilmes *in vitro* na ausência de saliva, o que foi demonstrado em ensaios de formação de biofilmes maduros (18h), utilizando-se placas de microtitulação com 96 poços de diferentes marcas/modelos, diversas condições atmosféricas e variados meios de cultura (Figuras 14 e 15). Uma das razões para essas diferenças reside no fato de que *S. sanguinis* não apresenta os genes *gtfB*, *gtfC* e *gtfD* de *S. mutans*, os quais codificam as enzimas glicosiltransferases, responsáveis pela síntese de glucano a partir da sacarose, pois os glucanos são polissacarídeos de glicose essenciais para a formação de biofilmes e virulência de *S. mutans* (Senadheera *et al.*, 2005; Mattos-Graner, 2008).

A leitura da literatura disponível indica que poucos estudos descrevem o crescimento de biofilmes *in vitro* de *S. sanguinis*. Ge *et al.* (2008a) testaram a formação de biofilmes maduros *in vitro* utilizando a cepa *S. sanguinis* SK36 e diversos meios de cultura, como BHI, BM [meio de cultura modificado por Loo *et al.* (2000) a partir dos meios utilizados por Carlsson (1972) e Jenkisson (1986)], MQD [Meio Quimicamente Definido utilizado por Yoshida & Kuramitsu (2002)], saliva, FCM [Meio Quimicamente Definido desenvolvido por Terleckyj *et al.* (1975)], THB, TSB e Triptona com extrato de levedura, suplementados, ou não, com sacarose ou glicose. Ge *et al.*, 2008a demonstraram que biofilmes robustos

(A_{600nm}) foram formados em meio BM suplementado com 1% de sacarose em condições anaeróbias, seguido dos meios FCM e TSB com 1% de sacarose em aerobiose. Estes dados diferem dos resultados do presente estudo, visto que não se observou formação de biofilmes nos ensaios em microplaca de titulação após 18h de incubação em aerobiose, inclusive em ensaios com o meio de cultura TSB acrescido de 1% de sacarose. Diferenças metodológicas ou do tipo de superfície utilizada poderiam explicar estas diferenças. Como controle das condições experimentais utilizadas, a cepa *S. mutans* UA159 foi incluída nos ensaios e demonstrou formação de biofilmes de grande biomassa, o que indica diferenças nos mecanismos de formação de biofilmes entre as espécies *S. mutans* e *S. sanguinis* (Figuras 14 e 15). Por outro lado, análises do genoma de SK36 revelaram um grande número de possíveis adesinas de superfície (Xu *et al.*, 2007), sugerindo que a formação de biofilmes dentários por *S. sanguinis* é altamente dependente da presença de glicoproteínas salivares adsorvidas às superfícies bucais, o que motivou as análises das etapas iniciais de formação de biofilmes sobre superfícies recobertas por saliva humana.

Resultados de biofilmes iniciais (2 e 4 h) realizados em presença ou não de saliva, indicaram grande capacidade de formação de biofilmes por *S. sanguinis* *in vitro* na presença de saliva, o que é compatível com o reconhecido papel de *S. sanguinis* como colonizador primário dos dentes e, portanto, como uma das espécies que interagem diretamente com a PA (Rosan & Lamont, 2000; Li *et al.*, 2004; Kuramitsu *et al.*, 2007; Hojo *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011). Assim, para formação de biofilmes por *S. sanguinis*, torna-se imprescindível a presença de glicoproteínas salivares, e esta condição é influenciada pela exposição ao oxigênio. Os colonizadores iniciais, incluindo *S. sanguinis*, *S. gordonii* e *Streptococcus oralis*, aderem-se à PA em superfícies sólidas através de ligações moleculares fracas não covalentes, como interações eletrostáticas, hidrofóbicas e pontes de hidrogênio (Li *et al.*, 2004; Hahnel *et al.*, 2009). Este evento promove alterações locais e permite subsequente adesão de microrganismos com adesinas aos componentes de *S. sanguinis*. Surgem após esta etapa, espécies como *S.*

mutans (patógeno da cárie) e patógenos periodontais, os quais podem induzir inflamação gengival e periodontal (Pihlstrom *et al.*, 2005; Ikeda *et al.*, 2007). Neste estudo, na presença de saliva, *S. sanguinis* demonstrou maior capacidade de adesão e crescimento em biofilmes sobre superfícies de vidro, quando comparado com a cepa *S. mutans* UA159. Sob condições favoráveis para o crescimento de *S. sanguinis* SK36 em biofilmes (presença de saliva e aerobiose), a inativação de *vicK* promoveu drástica redução da formação de biofilmes (Figuras 16 e 17), sugerindo que, embora os mecanismos de formação de biofilmes por *S. sanguinis* sejam distintos de *S. mutans*, o sistema VicRK regula funções importantes para a capacidade de crescimento em biofilmes em ambas as espécies.

Através de análise *in silico*, identificaram-se sequências-alvo de VicR em regiões promotoras de alguns genes possivelmente envolvidos na formação de biofilmes de *S. sanguinis*, por codificar glicosiltransferases e proteínas de superfície. Estes incluem os genes que codificam o ortólogo de GbpB (*ssapcsB*), proteínas de superfície [*pmC* (SSA_1543 - ortólogo ao gene que codifica uma proteína de membrana em *S. pneumoniae*) e *lysM* (SSA_0094)], além de genes envolvidos na síntese e resistência a H₂O₂ (*spxB* e *ccpA*).

Na condição atmosférica descrita como ideal para a formação de biofilme por *S. sanguinis* e onde melhor se observou o efeito da inativação de *vicK* na formação de biofilme, existem reduções significativas na expressão de alguns genes em SKvicK comparado com a cepa selvagem (Figura 16, 17 e 20). Observou-se uma redução significativa de 6,4 vezes ($p < 0,01$) na expressão do gene *ssapcsB* (proteína PcsB), 23,8 vezes ($p < 0,01$) no gene *lysM* (proteína de parede celular – LysM) e uma redução de 2,3 vezes na expressão do gene *pmC* ($p = 0,809$). Também ocorreu uma redução de 2,5 vezes do gene *gtfP* ($p = 0,17$), cuja função não está elucidada, mas se acredita que seja semelhante à função das glicosiltransferases em *S. mutans*. O papel específico destes genes que codificam proteínas de superfície celular com interações com a saliva precisa ser investigado, em especial o papel da proteína LysM, uma vez que a expressão de *lysM* foi claramente reduzida no mutante SKvicK.

6.2. INATIVAÇÃO DE *vick* AFETA DIVERSAS CARACTERÍSTICAS DE SUPERFÍCIE CELULAR DE *S. SANGUINIS* E A EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOGÊNESE DA PAREDE CELULAR.

Além das diferenças na expressão de adesinas e nos mecanismos de formação de biofilmes *in vitro*, outras propriedades de superfície celular parecem ser bem distintas entre a espécie de *S. mutans* e *S. sanguinis*. A hidrofobicidade de superfície, característica que influencia a adesão bacteriana inicial às superfícies, varia entre as espécies (Quirynen *et al.*, 1995; Teughels *et al.*, 2006).

No presente estudo, foi possível observar que as cepas selvagens de *S. sanguinis* (SK36 e DSS-10) são altamente hidrofóbicas, como relatado por Lee *et al.* (2011), ao contrário de *S. mutans* UA159. Porém, em ambas as espécies, a inativação de *vick* promoveu aumento da hidrofobicidade, sendo este mais significativo no mutante *vick* de *S. mutans* UA159 (UAvicK) (Figura 21), coincidindo com dados de estudos anteriores (Duque *et al.*, 2011). Duque *et al.* (2011) relataram que a inibição do gene *gbpB*, o qual é essencial para a viabilidade de *S. mutans*, promove aumento significativo na hidrofobicidade da superfície celular, alterando drasticamente o fenótipo de crescimento em biofilmes, morfologia e divisão celular. Em *S. mutans* UA159, a inativação de *vick* promove uma redução de cerca de 10 vezes na produção de GbpB (Duque *et al.*, 2011). Verificou-se que a expressão do gene *ssapcsB* (SSA_0019), ortólogo de *gbpB* em *S. sanguinis*, é apenas 2 vezes menor ($p < 0,01$) em SKvicK do que na cepa selvagem SK36 na metade da fase *log*. Talvez a diferença na expressão de *gbpB* entre as espécies *S. sanguinis* e *S. mutans* explique as diferenças nos padrões de hidrofobicidade celular entre as cepas *S. mutans* UA159 e UAvicK, e as respectivas cepas SK36 e SKvicK (Figura 21).

O crescimento de *S. sanguinis* SKvicK em caldo diferiu claramente do da cepa ancestral. Células de *S. sanguinis* SK36 precipitam durante o crescimento em caldo, mas a suspensão torna-se homogênea quando agitada. O mesmo não ocorre com SKvicK, o qual forma grandes agregados responsáveis pelo aspecto

floculado das culturas (Figura 13). As alterações do aspecto das culturas do mutante foram melhor observadas sob condições de aerobiose. As alterações dos aspectos das culturas podem estar associadas ao aumento da hidrofobicidade celular em SKvicK. Além disto, alterações na expressão de diversos genes envolvidos na biogênese de parede celular podem estar associadas ao crescimento atípico de SKvicK.

O processo de divisão celular em bactérias envolve diversas hidrolases de mureína, algumas destas denominadas autolisinas. Bactérias normalmente expressam um grupo de hidrolases de mureína que podem ter funções específicas e/ou redundantes e que desempenham diferentes funções fisiológicas. Estas funções incluem o remodelamento da parede celular durante o crescimento, a separação de células, a autólise, a competência, a montagem de estruturas de superfície celular e formação de biofilmes (Vollmer *et al.*, 2008). Proteínas com homologia a hidrolases de mureína identificadas em *S. mutans* incluem a GbpB (Mattos-Graner *et al.*, 2001) e LysM (Stipp, 2010). A GbpB participa da formação de biofilmes, possivelmente mediando as interações da parede celular bacteriana à matriz extracelular de biofilmes (Mattos-Graner *et al.*, 2001, Duque *et al.*, 2011). O papel de LysM no crescimento em biofilmes precisa ser definido. Em *S. sanguinis*, ortólogos de GbpB e LysM foram também identificados (Tabela 3) e, como demonstrado em *S. mutans* (Stipp, 2010; Duque *et al.*, 2011), também parecem ser reguladas pelo sistema VicRK (Figura 25). Em aerobiose, especialmente na fase *mid-log*, os genes que codificam possíveis hidrolases de mureína de *S. sanguinis* (*ssapcsB*, *lysM* e *cwdP*), tiveram sua expressão significativamente reduzida (Figura 25). O gene *cwdP* (SSA_0304) codifica uma proteína hipotética anotada no Genbank como uma proteína de degradação de parede celular, ortóloga a codificada pelo gene SMu.367 de *S. mutans*, a qual apresenta domínios característicos de hidrolases de mureína, mas sem atividade experimentalmente confirmada.

6.3. INATIVAÇÃO DE *vick* TORNA *S. SANGUINIS* MAIS SENSÍVEL AO ESTRESSE OXIDATIVO E MAIS RESISTENTE À ATIVIDADE AUTOLÍTICA.

O sistema de dois componentes VicRK parece estar implicado na resposta ao estresse oxidativo em *S. mutans* (Deng *et al.*, 2007), embora a inativação de *vick* não tenha promovido aumento significativo na sensibilidade ao estresse oxidativo em *S. mutans* em diferentes estudos (Senadheera *et al.*, 2005; Duque *et al.*, 2011). Uma vez que *S. sanguinis* é um colonizador primário dos dentes, iniciando a formação de biofilmes em condições de maior exposição ao oxigênio, investigou-se o efeito da inativação de *vick* na sensibilidade desta espécie ao estresse oxidativo. A cepa *S. sanguinis* SK36 crescida sob anaerobiose demonstrou ser mais resistente ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) do que a mutante SKvicK (Figura 23B), sugerindo importância do sistema VicRK para a resposta e adaptação ao estresse oxidativo. Curiosamente, quando SK36 e SKvicK são crescidas em aerobiose antes da exposição a H_2O_2 , não há diferenças significativas na redução da viabilidade entre as cepas selvagem e mutante (Figura 23A), o que sugere que, quando crescidas em aerobiose, cepas *S. sanguinis* expressam funções que promovem resistência ao estresse oxidativo em processos independentes de VicRK. Os mecanismos de resistência de *S. sanguinis* a H_2O_2 não são totalmente compreendidos, mas é provável que, para produzir H_2O_2 na presença de oxigênio, *S. sanguinis* expresse genes de resistência a este agente oxidante, o que talvez, envolva mais de um sistema regulador de transcrição. Quando em anaerobiose, *S. sanguinis* não produz quantidades de H_2O_2 suficientes para inibir o crescimento de *S. mutans* (Kreth *et al.*, 2008).

Estudos prévios demonstram que, sob aerobiose, *S. sanguinis* produz H_2O_2 a partir da atividade da piruvato-oxidase codificada pelo gene *spxB* (Marquis, 1995; Kreth *et al.*, 2008; Ramos-Montañez *et al.*, 2008). A produção de H_2O_2 por *S. sanguinis* têm papel importante para o estabelecimento desta espécie em biofilmes, porque inibe espécies competidoras como *S. mutans*

(Baldek & Marquis, 2008; Kreth *et al.*, 2005a; Kreth *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011a). Em *S. sanguinis*, o gene *spxB* é regulado negativamente por CcpA (*catabolic control protein A*), a proteína A de controle catabólico (Kreth *et al.*, 2009). As investigações descritas nesta tese indicam que *spxB*, também seja regulado positivamente por VicRK, uma vez que a inativação de *vicK* em SK36 diminuiu em cerca de 3 vezes a expressão de *spxB* em aerobiose (Figura 25). A inativação de *vicK* também não produziu alterações significativas na expressão de *ccpA*, o qual codifica a proteína CcpA que reprime a expressão de *spxB* (Zheng *et al.*, 2011). Ensaios para avaliar interações entre a proteína VicR e sequências reguladoras de *spxB* são necessários para confirmar o papel de VicRK na regulação deste gene. Comparações da produção de H₂O₂ entre SK36 e SKvicK, também poderão indicar se o sistema VicRK participa da produção de H₂O₂ através da indução de *spxB*. Outras características de superfície reguladas por VicRK podem influenciar na sensibilidade ao estresse oxidativo, entre elas a expressão de *pcsB* (Duque *et al.*, 2011).

Em *S. pneumoniae*, o próprio gene que codifica a piruvato-oxidase (*spxB*) parece estar envolvido na resistência da mesma a H₂O₂ (Pericone *et al.*, 2003). Entretanto, em nosso estudo, sob anaerobiose, condição em que SKvicK demonstrou maior sensibilidade ao estresse oxidativo, não foram detectadas variações significativas na expressão de *spxB* (Figura 25), o que indica que outros genes estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. Em estudo de Chen *et al.* (2011), a inativação de *spxB* em *S. sanguinis* promoveu redução da produção de H₂O₂, mas o mutante ainda foi capaz de produzir este composto, o que sugere que a piruvato-oxidase não seja a única oxidase responsável pela produção de H₂O₂.

Outra consequência da produção de H₂O₂ é a liberação de DNA genômico para o meio extracelular (eDNA), através da produção de autolisinas. O eDNA é um importante componente da matriz extracelular de biofilmes em diversas espécies bacterianas (Hansen *et al.*, 2001; Kreth *et al.*, 2009; Dominiak *et al.*, 2010; Fleming & Wingender, 2010; Klein *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2010). Há evidência de

que a produção de H_2O_2 ative autolisinas, com posterior liberação de DNA intracelular para o meio extracelular (Kreth *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011a). Entretanto, as autolisinas ativadas neste processo não foram identificadas e caracterizadas. A inativação de *vicK* em *S. mutans* diminui significativamente a atividade autolítica dessa espécie (Duque *et al.*, 2011), mas verificamos um efeito menor da inativação de *vicK* na atividade autolítica de *S. sanguinis*. Isto pode ter ocorrido, em parte, devido à maior resistência natural de *S. sanguinis* à autólise nas condições testadas, quando comparada à *S. mutans* UA159 (Figura 22). Os ensaios de autólise realizados neste trabalho demonstram que *S. sanguinis* sofre pouca autólise durante pelo menos quatro dias de incubação em aerobiose a 44°C, o que é semelhante aos resultados obtidos por Kreth *et al.* (2009), embora tenham utilizado um ensaio diferente para determinação da atividade autolítica. Estes autores sugeriram que a liberação de DNA promovida pela produção de H_2O_2 ocorre através de um processo independente da autólise celular.

O gene *sodA* codifica a enzima superóxido-dismutase, a qual catalisa uma reação de óxido-redução a partir do ânion superóxido produzindo oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Dessa forma, caracteriza-se como uma importante defesa anti-oxidante para células expostas ao oxigênio. Esse gene possui alta similaridade com o gene SMu.629 (*sod*) de *S. mutans*, e parece possuir a importante função de adaptar esta espécie bacteriana ao estresse oxidativo. Aparentemente, o gene SMu.629 (*sod*), em *S. mutans*, não é importante para a tolerância ao estresse oxidativo na forma de H_2O_2 , mas essa proteína é essencial para permitir que as células cresçam em ambientes oxidantes (Ahn & Burne, 2007). O gene SMu.629 também está envolvido, direta ou indiretamente, na atividade e maturação da AtIA, uma autolisina que modula propriedades de superfície celular, formação de biofilmes, autólise e competência (Brown *et al.*, 2005; Shibata *et al.*, 2005; Ahn & Burne, 2006).

Em *S. mutans*, a inativação de *vicK* promove redução considerável na expressão de SMu.629 e na produção de AtIA. Diferentemente em *S. sanguinis*, a inativação de *vicK* não alterou significativamente a expressão de *sodA* sob

diferentes condições atmosféricas (Figura 25). A ausência de alteração significativa da expressão de *sodA*, no mutante SKvicK, especialmente sob aerobiose, é compatível com o pequeno efeito da inativação de vicK na resistência ao estresse oxidativo.

7. CONCLUSÃO

Com bases nos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que em *Streptococcus sanguinis*:

7.1 O gene *vick*, codificador da histidina-quinase (sensora) do SDC VicRK, não é um gene essencial para a viabilidade de *Streptococcus sanguinis* SK36, sendo possível inativá-lo.

7.2 O sistema VicRK regula funções fisiológicas importantes para a morfogênese, crescimento em fase planctônica e para a formação de biofilmes na presença de saliva.

7.3 A inativação de *vick* promove aumento na hidrofobicidade de superfície e diminui a resistência ao estresse oxidativo sob condições atmosféricas específicas.

7.4 A inativação de *vick* reduz significativamente a atividade dos genes *pcsB*, *lysM*, *cwdP*, possivelmente relacionados à biogênese do envelope celular e crescimento em biofilmes.

7.5 A inativação de *vick* reduz significativamente a expressão do gene *spxB* sob aerobiose, demonstrando que o sistema VicRK participa da regulação deste gene, o qual está envolvido na capacidade de *S. sanguinis* se estabelecer em biofilmes bucais.

REFERÊNCIAS*

1. Ahn SJ, Browngardt CM, Burne RA. Changes in biochemical and phenotypic properties of *Streptococcus mutans* during growth with aeration. Appl Environ Microbiol. 2009; 75: 2517-2527.
2. Ahn SJ, Burne RA. Effects of oxygen on biofilm formation and the AtlA autolysin of *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2007; 189: 6293-6302.
3. Ahn SJ, Burne RA. The *atlA* operon of *Streptococcus mutans*: role in autolysis maturation and cell surface biogenesis. J Bacteriol. 2006; 188: 6877-6888.
4. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klaue M, Webb JS, Kjelleberg S *et al.* A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. Mol Microbiol. 2006; 59: 1114-1128.
5. Auzat I, Chapuy-Regaud S, Le Bras G, Dos SD, Ogunniyi AD, Le TI *et al.* The NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae*: its involvement in competence and virulence. Mol Microbiol. 1999; 34: 1018-1028.
6. Baldek JD, Marquis RE. Targets for hydrogen-peroxide induced damage to suspension and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. Can J Microbiol. 2008; 54: 868-875.
7. Banas JA, Vickerman MM. 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.

8. Bayer AS, Bolger AF, Taubert KA, Wilson W, Steckelberg J, Karchmer AW *et al.* Diagnosis and management of infective endocarditis and its complications. *Circulation* 1998; 98: 2936-2948.
9. Bayles KW. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5: 721-726.
10. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL *et al.* Molecular analysis of species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1001-1009.
11. Berezow AB, Darveau RP. Microbial shift and periodontitis. *Periodontology* 2000 2011; 55: 36-47.
12. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 24:1513-23.
13. Bizzini A, Beggah-Moller S, Moreillon P, Entenza JM. Lack of *in vitro* biofilm formation does not attenuate the virulence of *Streptococcus gordonii* in experimental endocarditis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006; 48: 419-423.
14. Brown TA Jr, Ahn SJ, Frank RN, Chen YY, Lemon JA, Burne RA. A hypothetical protein of *Streptococcus mutans* is critical for biofilm formation. *Infect Immun.* 2005; 73: 3147-3151.
15. Carlsson J. Nutritional requirements of *Streptococcus sanguis*. *Arch Oral Biol.* 1972; 17: 1327-1322.
16. Cavasin Filho JC, Giovani EM. Xerostomy, dental caries and periodontal disease in HIV⁺ patients. *Braz. J. Infect. Dis.* 2009; 13(1): 13-17.

17. Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin M. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun*. 2000; 68: 4018-4023.
18. Chen L, Ge X, Dou Y, Wang X, Patel JR, Xu P. Identification of hydrogen peroxide production-related genes in *Streptococcus sanguinis* and their functional relationship with pyruvate oxidase. *Microbiology* 2011; 157: 13-20.
19. Chia JS, Lee YY, Huang PT, Chen JY. Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. *Infect Immun*. 2001; 69(4): 2493-2501.
20. Das T, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC, Krom BP. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76: 3405-3408.
21. Deng DM, Liu MJ, Ten Cate JM, Crielaard W. The VicRK system of *Streptococcus mutans* responds to oxidative stress. *J Dent Res*. 2007; 86: 606-610.
22. Dominiak DM, Nielsen JL, Nielsen PH. Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strenght in mixed microbial biofilms. *Environ Microbiol*. 2010; 13: 710-721.
23. Douglas CW, Heath J, Hampton KK, Preston FE. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol* 1993; 39: 179-182.
24. Duque C, Stipp RN, Wang B, Smith DJ, Höfling JF, Kuramitsu HK *et al*. Down-regulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm

formation and cell surface characteristics of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 2011; 79: 786-796.

25. Facklam R. What happened to the *streptococci*: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 613-630.
26. Filoche S, Wong L, Sissons CH. Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. J Dent Res. 2010; 89: 8-18.
27. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010 ; 8 : 623-633.
28. Fröjd V, Chávez de Paz L, Andersson M, Wennerberg A, Davies JR, Svensäter G. *In situ* analysis of multispecies biofilm formation on customized titanium surfaces. Mol Oral Microbiol. 2011; 26: 241-252.
29. Garcia-Bustos JF, Chait BT, Tomasz A. Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. J Biol Chem. 1987; 262: 15400–15405.
30. Garcia-Mendoza A, Liebana J, Castilho AM, de La Higuera A, Piedrola G. Evaluation of the capacity of oral streptococci to produce hydrogen peroxide. J Med Microbiol. 1993; 39: 434-439.
31. Ge X (a), Kitten T, Chen Z, Lee SP, Munro CL, Xu P. Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence. Infect Immun. 2008; 76: 2551-2559.
32. Ge Y (b), Caufield PW, Fisch GS, Li Y. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization correlated with caries experience in children. Caries Res. 2008; 42: 444-448.

33. Gibbons RJ, van Houte J. On the formation of dental plaques. J Periodontol. 1973; 6: 347-360.
34. Ginsburg I, Sadovnic M. Gamma globulin, Evan's blue, aprotinin A PLA₂ inhibitor, tetracycline and antioxidants protect epithelial cells against damage induced by synergism among streptococcal hemolysins, oxidants and proteinases: relation to the prevention of post-streptococcal sequelae and septic shock. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998; 22: 247-256.
35. Gong K, Herzberg MC. *Streptococcus sanguis* expresses a 150-kilodalton two-domain adhesin: characterization of several independent adhesin epitopes. Infect Immun. 2007; 65: 3815-3821.
36. Gong K, Mailloux L, Herzberg MC. Salivary film expresses a complex, macromolecular binding site for *Streptococcus sanguis*. J Biol Chem. 2000; 275: 8970-8974.
37. Gryllos I, Tran-Winkler HJ, Cheng M-F, Chung H, Bolcome III R, Lu W *et al.* Induction of group A *Streptococcus* virulence by a human antimicrobial peptide. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105: 16755-16760.
38. Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Bürgers R. Surface characterization of dental ceramics and initial streptococcal adhesion in vitro. Dent Mater. 2009; 25: 969-975.
39. Hamada S, Torii M, Kotani S, Tsuchitani Y. Adherence of *Streptococcus sanguis* clinical isolates to smooth surfaces and interactions of the isolates with *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. Infect Immun. 1981; 32: 364-372.

40. Hansen MC, Palmer RJ Jr, Udsen C, White DC, Molin S. Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. *Microbiology* 2001; 147: 1383-1391.
41. Higuchi M, Yamamoto Y, Poole LB, Shimada M, Sato Y, Takahashi N *et al.* Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidative stress of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 1999; 181: 5940-5947.
42. Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* 2009; 88: 982-990.
43. Hung DCI, Downey JS, Ayala EA, Kreth J, Mair R, Senadheera DB *et al.* Characterization of DNA binding sites of the ComE response regulator from *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2011; 193: 3642-3652.
44. Ikeda M, Matin K, Nikaido T, Foxton RM, Tagami J. Effect of surface characteristics on adherence of *S. mutans* biofilms to indirect resin composites. *Dent Mater J.* 2007; 26: 915-923.
45. Jakubovics NS, Smith AW, Jenkinson HF. Oxidative stress tolerance is manganese (Mn^{2+}) regulated in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* 2002; 148: 3255-3263
46. Jenkinson HF. Cell-surface proteins of *Streptococcus sanguis* associated with cell hydrophobicity and coaggregation properties. *J Gen Microbiol.* 1986; 132: 1575-1589.
47. Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH-M *et al.* Dynamics of *Streptococcus mutans* transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. *PLoS One* 2010; 5: e13478.

48. Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8:471-480.
49. Kreth J (a), Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol.* 2005; 187: 7193-7203.
50. Kreth J (b), Merritt J, Shi W, Qi F. Co-ordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species. *Mol Microbiol.* 2005; 57: 392-404.
51. Kreth J, Vu H, Zhang Y, Herzberg MC. Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. *J Bacteriol.* 2009; 191: 6281-6291.
52. Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2008; 190: 4632-4640.
53. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2007; 71: 653-670.
54. Lau PC, Sung CK, Lee JH, Morrison DA, Cvitkovitch DG. PCR ligation mutagenesis in transformable streptococci: application and efficiency. *J Microbiol Methods.* 2002; 49: 193-205.
55. Lee B-C, Jung G-Y, Kim D-J, Han J-S. Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia *in vitro*. *J Adv Prosthodont.* 2011; 3: 81-84.

56. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD *et al.* Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. J Appl Microbiol. 2004; 97: 1311-1318.
57. Liu M, Hanks TS, Zhang J, McClure MJ, Siemsen DW, Elser JL *et al.* Defects in *ex vivo* and *in vivo* growth and sensitivity to osmotic stress of group A *Streptococcus* caused by interruption of response regulator gene *vicR*. Microbiology 2006; 152: 967-978.
58. Loo CY, Corliss DA, Ganeshkumar N. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. J Bacteriol. 2000; 182: 1374-1382.
59. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Microbiologia de Brock. 12 ed. Porto Alegre. Artmed; 2010.
60. Marquis RE. Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. J Ind Microbiol. 1995; 15: 198-207.
61. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology 2003; 149: 279-294.
62. Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. Infect Immun. 2001; 69: 6931-6941.
63. Mattos-Graner RO. Efeito da inativação de genes regulatórios e da exposição a macrófagos murinos na expressão de glucosiltransferases B e C e de

glucan-binding protein B em isolados de *Streptococcus mutans*. Projeto FAPESP; 2008.

64. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. Infect Immun. 2004; 72: 3658-3663.
65. Moscoso M, Claverys JP. Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. Mol Microbiol. 2004; 54: 783-794.
66. Mylonakis E, Calderwood SB. Infective endocarditis in adults. N Engl J Med. 2001; 345: 1318-1330.
67. Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpaa J, Garsin DA, Hook M, Erlandsen SL *et al*. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. J Clin Investig. 2006; 116: 2799-2807.
68. Ng WL, Kazmierczak KM, Winkler ME. Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. Mol Microbiol. 2004; 53: 1161-1175.
69. Ng WL, Robertson GT, Kazmierczak KM, Zhao J, Gilmour R, Winkler ME. Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6. Mol Microbiol. 2003; 50: 1647-1663.
70. Ng WL, Tsui HC, Winkler ME. Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF)

response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol. 2005; 187: 7444-7459.

71. Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson HF. *Streptococcus* adherence and colonization. Microbiol Mol Biol Rev. 2009; 73: 407-450.
72. Paik S, Senty L, Das S, Noe JC, Munro CL, Kitten T. Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by signature-tagged mutagenesis. Infect Immun. 2005; 73: 6064-6074.
73. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. Annu Rev Microbiol. 2003; 57: 677-701.
74. Pereira AG, Neves AM, Trindade AC. Imunologia da cárie dentária. Acta Med. Port. 2010; 23: 663-668.
75. Pericone CD, Park S., Imlay JA, Weiser JN. Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the Fenton reaction. J Bacteriol. 2003; 185: 6815-6825.
76. Perry D, Kuramitsu HK. Genetic transformation of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 1981; 32(3): 1295-7.
77. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. Lancet 2005; 366: 1809-1820.
78. Presterl E, Grisold AJ, Reichmann S, Hirschl AM, Georgopoulos A, Graninger W. Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2005; 55: 45-50.

79. Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S *et al.* Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 2007; 153: 2083-2092.
80. Quirynen M, Bollen CM. The influence of surfaces roughness and surface-free energy on supra- and sub-gingival plaque formation in man. A review of the literature. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 1-14.
81. Ramos-Montañez S, Tsui HC, Wayne KJ, Morris JL, Peters LE, Zhang F *et al.* Polymorphism and regulation of the *spxB* (pyruvate oxidase) virulence factor gene by CBS-HotDog domain protein (SpxR) in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2008; 67: 729-746.
82. Rice KC, Bayles KW. Molecular control of bacterial death and lysis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008; 72: 85-109.
83. Rice KC, Mann EE, Endres JL, Weiss EC, Cassat JE, Smeltzer MS *et al.* The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 8113-8118.
84. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2000; 2: 1599-1607.
85. Rosenberg M, Perry A, Bayer EA, Gutnick DL, Rosenberg E, Ofek I. Adherence of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to human epithelial cells and to hexadecane; *Infect Immun.* 1981; 33: 29-33.
86. Ryan CS, Kleinberg I. Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide. *Arch Oral Biol* 1995; 40: 753-763.

87. Scheld WM, Valone JA, Sande MA. Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets, and fibrin. J Clin Invest. 1978; 61: 1394-1404.
88. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DC *et al.* A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *ttf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. J Bacteriol. 2005; 187: 4064-4076.
89. Shelburne III SA, Granville C, Patel MP, Musser JM. Growth characteristics of and virulence factor production by group A *Streptococcus* during cultivation in human saliva. Infect Immun. 2005; 73: 4723-4731.
- .
90. Shibata Y, Kawada M, Nakano Y, Toyoshima K, Yamashita Y. Identification and characterization of an autolysin-encoding gene of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 2005; 73: 3512-3520.
91. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28: 12-55.
92. Steinmoen H, Knutsen E, Havarstein LS. Induction of natural competence in *Streptococcus pneumoniae* triggers lysis and DNA release from a subfraction of the cell population. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 7681-7686.
93. Stipp RN. Caracterização dos regulons CovR e VicRK em *Streptococcus mutans* [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010.
94. Stipp RN, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB*, *ttfC*, and *gbpB* and their putative response

regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol Immunol. 2008; 23: 1-8.

95. Terleckyj B, Willet NP, Shockman GD. Growth of several cariogenic strains of oral streptococci in a chemically defined medium. Infect Immun. 1975; 11: 649-655.
96. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M. Effects of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. Clin Oral Implants Res 2006; 17: 68-81.
97. Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, Hancock LE. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. J Bacteriol. 2008; 190: 5690-5698.
98. Tittmann K, Wille G, Golbik R, Weidner A, Ghisla S, Hubner G. Radical phosphate transfer mechanism for the thiamin diphosphate- and FAD-dependent pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. Kinetic coupling of intercofactor electron transfer with phosphate transfer to acetyl-thiamin diphosphate via a transient FAD semiquinone/hydroxyethyl-ThPD radical pair. Biochemistry 2005; 44: 13291-1330.
99. Tleyjeh IM, Steckelberg JM, Murad HS, Anavekar NS, Ghomrawl HM, Mirzoyev Z et al. Temporal trends in infective endocarditis: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. JAMA 2005; 293: 3022-3028.
100. Uehara Y, Agematsu K, Kikuchi K, Matsuzaki S, Imai S, Takamoto M *et al*. Secretory IgA, salivary peroxidase, and catalase-mediated microbicidal activity during hydrogen peroxide catabolism in viridans streptococci: pathogen coaggregation. J Infect Dis. 2006; 194: 98-107.

101. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32:259-286.
102. Wang BY, Chi B, Kuramitsu HK. Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms. *Oral Microbiol Immunol.* 2002; 17: 108-112.
103. Warner JB, Lolkema JS. CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67: 475-490.
104. Warren RAJ. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu Rev Microbiol.* 1996; 50: 183-212.
105. Weiser JN, Austrian R, Screenivasan PK, Masure HR. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun.* 1994; 62: 2582-2589.
106. Whaley RA, Beighton D. Current classification of the oral *streptococci*. *Oral Microbiol Immunol.* 1998; 13: 195-216.
107. Whaley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 1998; 13: 195-216.
108. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M *et al.* Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care

and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. J Am Dent Assoc. 2007; 138: 739-760.

109. Winkler ME, Hoch JA. Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. J Bacteriol. 2008; 190: 2645-2648.
110. Xu P, Alves JM, Kitten T, Brown A, Chen Z, Ozaki LS *et al.* Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. J Bacteriol. 2007; 189: 3166-3175.
111. Yoshida A, Kuramitsu KH. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2002; 68: 6283-6291.
112. Zheng L (b), Chen Z, Itzek A, Ashby M, Kreth J. Catabolite control protein A controls hydrogen peroxide production and cell death in *Streptococcus sanguinis*. J Bacteriol. 2011; 193: 516-526.
113. Zheng L-Y (a), Itzek A, Chen Z-Y, Kreth J. Oxygen dependent pyruvate oxidase expression and production in *Streptococcus sanguinis*. Int J Oral Sci. 2011; 3: 82-89.