

**THAIS DE CÁSSIA NEGRINI**

**Análise dos padrões de internalização de cepas de  
*Streptococcus mutans* por macrófagos murinos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Mestre em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Microbiologia e Imunologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner

**Co-orientador:** Prof. Dr. Edgard Graner

**PIRACICABA**

**2008**

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

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

N312a	<p>Negrini, Thais de Cássia. Análise dos padrões de internalização de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> por macrófagos murinos. / Thais de Cássia Negrini. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadores: Renata de Oliveira Mattos-Graner, Edgard Graner. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Fagocitose. 2. Cárie dentária. 3. Microorganismos. I. Mattos-Graner, Renata de Oliveira. II. Graner, Edgard. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	---

Título em Inglês: Analysis of patterns of uptake of *Streptococcus mutans* strains by murine macrophages

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Phagocytosis. 2. Dental caries. 3. Microorganisms

Área de Concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Renata de Oliveira Mattos-Graner, Denise Madalena Palomari Spolidorio, José Francisco Höfling

Data da Defesa: 22-02-2008

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 22 de Fevereiro de 2008, considerou a candidata THAIS DE CASSIA NEGRINI aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Renata de Oliveira Mattos Graner".

---

PROFa. DRa. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Denise Madalena Palomari Spolidorio".

---

PROFa. DRa. DENISE MADALENA PALOMARI SPOLIDORIO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Jose Francisco Hofling".

---

PROF. DR. JOSE FRANCISCO HOFLING

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Anésio e Roseli**, pelo exemplo de vida e imenso amor. Aprendi com vocês a ter coragem, caráter, responsabilidade, honestidade, a não desanimar, a ser humilde. Obrigada pela presença constante, paciência, confiança, por compreenderem minha ausência e, principalmente, pelo incentivo em todos os momentos da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Agradeço,

À **Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner**, minha orientadora, pela confiança e oportunidades oferecidas. Pela ajuda, dedicação e competência. Agradeço pela orientação e contribuição à minha formação profissional.

Ao **Prof. Dr. Edgard Graner**, meu co-orientador, pela confiança, ajuda, atenção, competência e contribuição à minha formação profissional.

À **DEUS**, pela presença constante e oportunidades concedidas. Por permitir que **Santa Rita de Cássia** e todo **campo espiritual** estejam comigo em todos os momentos.

Aos meus irmãos, **Lucas e André**, pelo carinho, companheirismo, pela convivência, amizade, torcida e por estarem presentes na minha vida em todos os momentos.

À minha cunhada **Beatriz de Godoy** pela convivência, amizade e pelo carinho.

À minha tia **Rosemary Fazolaro** (*in memoriam*), por sempre acreditar na minha capacidade e sentir-se muito orgulhosa por isso. Por ter passado esse carinho aos seus filhos **Marcelo e Renata**, a sua nora **Lúzia** e ao seu neto **Vinícius**. Sei que, onde quer que esteja, está muito feliz.

Aos **familiares** que sempre estiveram na torcida em todos os momentos da minha vida, em especial ao meu tio **Vanderley Vicente Fazolaro**.

Ao **Rodrigo**, presente de Deus na minha vida, pelo amor, carinho, respeito, companheirismo, incentivo e apoio constantes. Por estar comigo em todos os momentos com imensa sinceridade, atenção, ajuda e paciência. Fazer com que o encontrasse foi o principal motivo de Deus ter iluminado minha vinda à Piracicaba.

À **família do Rodrigo**, por me acolher com tanto carinho, pela atenção e ajuda, pelo cuidado.

À minha professora e amiga, **Denise Madalena Palomari Spolidorio**, pelos cinco anos de orientação, convivência e amizade, pelo incentivo, por participar ter sido meu exemplo profissional e estar presente em todos os momentos da minha vida. A admiração que tenho por você, motiva-me a seguir o caminho escolhido.

À companheira de trabalho e amiga, **Cristiane Duque**, pelo carinho, pela sinceridade, confiança, amizade e ajuda constante, por fazer parte da minha vida em todos os momentos. Por ter dividido comigo conquistas e dificuldades durante nossa caminhada. Sua presença foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao professor da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, **Prof. Dr. José Francisco Höfling**, pela amizade, confiança, contribuição à minha formação profissional, pelo carinho e pelos conselhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Universidade Estadual de Campinas, por meio do Reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge** e à Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP, por meio do Diretor **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**, pela oportunidade cedida.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP, na pessoa do Coordenador Prof. Dr. **Mário Alexandre Coelho Senhoreti** e das secretárias, **Érica A. Pinto Senhoreti**, **Raquel Q. Marcondes César Sacchi** e **Tatiane Cristina Gava**.

Ao coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia Buco Dental, na pessoa do **Prof. Dr. Fausto Bérzin**, pelo carinho e pela atenção.

Ao professor da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, **Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves** pela experiência e ensinamentos.

Aos membros da banca do exame de qualificação, **Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves**, **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta** e **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes**, pelas sugestões e considerações feitas para o enriquecimento do trabalho.

À **Profa. Dra. Ana Lúcia Carrinho Ayrosa Rangel**, pela valiosa ajuda nos momentos iniciais de execução dos experimentos e pela amizade.

Ao amigo **Gustavo Monazzi**, do Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - FCFar/UNESP, pela disponibilidade, atenção, ajuda e amizade.

Ao **Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes**, pela disponibilidade, atenção, dedicação, pelo tempo dispensado para o meu aprendizado, pelo carinho.

Ao **Rafael Nóbrega Stipp**, por ter cedido as cepas mutantes para a realização de parte deste trabalho.

Aos funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, **Anderson Laerte Teixeira** e **Wilma C. Ferraz**, pelo carinho, respeito, disponibilidade, ajuda e amizade.

Aos professores das Disciplinas de **Histologia** e **Patologia**, pela colaboração e disponibilidade em permitir o uso do laboratório e de equipamentos para o desenvolvimento experimental de parte deste trabalho.

À funcionária da Disciplina de Histologia, **Eliene Narvaes**, pelo carinho, pela amizade, atenção e ajuda na parte de MET deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério, **Vanderley, Fábio** e **Flor**, pela disponibilidade e amizade.

Aos meus colegas de laboratório, **Bruna de Araújo Lima, Cristiane Duque, Daniel Saito, Flávia Sammartino Mariano, Fernando Tadeu Zamunér, Gustavo Alberto Pereda Obando, Iriana Carla Junqueira Zanin, Iza Teixeira Alves Peixoto, Janaína de Cássia Orlandi Sardi, Marlise Inês Klein, Paula Cristina Aníbal, Rafael Nóbrega Stipp, Regianne Umeko kamiya, Rodolfo Alberto Pires de Camargo, Ruchele Dias Nogueira, Sérgio Eduardo Braga da Cruz, Thiago Taieth** e **Vivian Fernandes Furletti**, pelo convívio e pela amizade.

Aos professores, funcionários e colegas da **Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP/UNICAMP**, em especial ao Departamento de **Patologia, Bioquímica**, pelo convívio, colaboração e coleguismo.

Aos professores, amigos e funcionários da **Faculdade de Odontologia de Araraquara - FOA/UNESP**, por terem participado da minha formação durante o Curso de Graduação em Odontologia, pelo carinho, respeito, pela atenção, humildade e amizade. Momentos relembrados com muita saudade.

Ao professor e amigo, **Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio**, pelo carinho, incentivo, pelos conselhos, por torcer por mim e estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos professores e amigos, **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa e Profa. Dra. Josimeri Hebling**, pela confiança, amizade, ajuda, pelo carinho, dedicação, pelos conselhos, por contribuírem para o meu crescimento profissional.

A professora e amiga, **Profa. Dra. Maria Rita Bramcini de Oliveira**, pelo carinho e amizade, por estar torcendo mim sempre.

À todos os meus tios de coração, em especial **Osvaldo e Lucimara Takakura, João e Beth Ciarrocci, Osvaldo e Edna Bernardi, José Fernandes, Sérgio e Sueli dos Santos, Luis César e Sônia Silva, Alberto e Hadiê Bernardi, Fernando e Aliceth Mandarino, Álvaro e Maria Cabreira, Arnaldo e Helena Bernardi, Ademir e Lurdinha Teixeira**, pelo carinho, apoio, pela torcida e amizade, por estarem presentes em todos os momentos da família Negrini.

À minha dentista **Dra. Maria Aparecida Tagliari**, pelo carinho, incentivo e por estar sempre torcendo por mim.

Às minhas companheiras de república, **Fabíola Galbiatti de Carvalho** e **Thais Manzano Parisotto**, pelo convívio, amizade. Em especial a **Fabíola**, pela sinceridade, pelos vários anos de companheirismo, ajuda, conselhos e amizade.

Às amigas **Cris, Déia, Jana** e **Ana Paula**, por terem cedido a república inúmeras vezes, pelas risadas, pelo convívio, pela amizade.

À **Ana Flávia Borges**, pela atenção e disponibilidade quando cheguei a Piracicaba.

À amiga **Milena Fernandes**, por ter sido minha dupla de trabalho durante os quatro anos de graduação, pela ajuda, amizade, pelo carinho.

À amiga **Denise Carleto Andia**, pelo carinho, por torcer por mim e estar sempre presente, pela amizade e sinceridade.

Às minhas amigas de Araraquara, em especial **Roberta Russomano, Sybele Saska** e **Vanessa Martelli**, pelos vários anos de amizade, torcida, lealdade e companheirismo. Obrigada por estarem presentes na minha vida em todos os momentos.

À **todos os meus amigos**, distantes ou não fisicamente, pelo carinho, pela torcida e amizade.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelos recursos concedidos para a realização desse trabalho (Processos n<sup>os</sup> 02/07156-1 e 05/57753-4).

À **todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

meus sinceros agradecimentos.

"Muitas vezes, as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas. Perdoe-as, assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro. Seja gentil, assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e inimigos verdadeiros. Vença, assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo. Seja honesto e franco, assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja. Seja feliz, assim mesmo.

O bem que você faz hoje, pode ser esquecido amanhã. Faça o bem, assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante. Dê o melhor de você, assim mesmo.

Veja você que, no final das contas,

É ENTRE VOCÊ E DEUS,

nunca entre você e as outras pessoas"

**Madre Teresa de Calcutá**

## RESUMO

*Streptococcus mutans* é o principal patógeno da cárie dentária. Antígenos (Ags) secretados ou associados à superfície celular de *S. mutans* participam deste processo e incluem a proteína ligante de glucano B (GbpB), a qual pode influenciar na susceptibilidade à infecção por *S. mutans*. Estudos recentes indicam que a expressão de antígenos de superfície reconhecida por fagócitos é controlada por sistemas de dois componentes (SDC) em espécies relacionadas a *S. mutans*. O objetivo deste projeto foi investigar o efeito de variações na produção de GbpB e a influência de dois SDC, Cov (de *control of virulence*) e Vic (de *virulence control*), no padrão de internalização de *S. mutans* por macrófagos de camundongos. Foram avaliadas 10 cepas clínicas distintas previamente caracterizadas quanto ao padrão de síntese de GbpB e quatro mutantes knock-out de dois SDC: dois mutantes *covR* e dois mutantes *vicH*. Para isto, macrófagos murinos da linhagem Balb/c foram cultivados em meio RPMI e expostos a diferentes cepas de *S. mutans*. Os níveis de internalização bacteriana por macrófagos foram determinados através da contagem de macrófagos com bactérias internalizadas, com auxílio de microscópio óptico. Os mecanismos de internalização foram caracterizados em ensaios semelhantes com macrófagos previamente tratados com inibidores específicos dos processos de fagocitose, macropinocitose e endocitose mediada por clatrina e em análises de microscopia eletrônica de transmissão. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de internalização das cepas que variavam quanto à produção de GbpB. Os mutantes *vicH* foram significativamente menos internalizados quando comparados às cepas selvagens e aos mutantes *covR*. As análises de MET e ensaios com inibidores de processos específicos de internalização indicam que, na ausência de opsoninas, *S. mutans* pode ser internalizado por diferentes mecanismos incluindo-se fagocitose, macropinocitose e endocitose mediada por clatrina. Esses dados poderão auxiliar na compreensão dos mecanismos de captação e processamento de *S. mutans* por células apresentadoras de antígenos

e dos fatores que influenciam no padrão de resposta imune adaptativa a estes microrganismos.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, macrófagos, internalização, sistemas de dois componentes, Vic, Cov, proteína ligante de glucano B.

## ABSTRACT

*Streptococcus mutans* are the main pathogens of dental caries. Antigens (Ags) secreted or associated with the bacterial cell surface may influence in the susceptibility to infection by *S. mutans*. These include the virulence protein Glucan-binding protein B (GbpB). Recent studies indicate that the expression of surface antigens recognized by phagocytes is controlled by systems of two components (TCS, Two Component System) in several streptococci species. The objective of this project was to investigate the effect of variations in the production of GbpB and the influence of the two-component systems (TCS), Cov and Vic, in the pattern of internalization of *S. mutans* by macrophages from mice under the absence of opsonins. Thus, levels of bacterial internalization by macrophages were evaluated in 10 different clinical strains of *S. mutans* previously characterized regarding the patterns of GbpB production, and in four knockout mutants of the TCS, two *covR*- mutants and two *vicH*- mutants. To this purpose, murine macrophages of the lineage Balb/c were cultured in RPMI medium and exposed to different strains of *S. mutans*. The levels of macrophages with internalized bacteria were determined with the help of an optical microscope. Patterns of bacteria internalization were analyzed in similar assays using macrophages previously treated with inhibitors of specific mechanisms of internalization (phagocytosis, macropinocytosis and endocytosis mediated by clathrin) and by electron transmission microscopy (ETM) analyses. There was no statistically significant difference in the efficiency of internalization between the strains that differed regarding production of GbpB. The mutants *vicH*- was significantly less internalized when compared with the respective wild type strains and mutants *covR*-. Analyses with specific inhibitors and ETM indicated that *S. mutans* can be internalized by phagocytosis, macropinocytosis and endocytosis mediated by clathrin. These data may help to understand the mechanisms by which *S. mutans* is internalized and processed by antigen-presenting cells and the factors affecting patterns of adaptive immune response to these bacteria.

Key-words: *Streptococcus mutans*, macrophages, internalization, two-component systems, Vic, Cov, Glucan-binding protein B.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.

°C: grau Celsius

%: porcentagem

Ag: antígeno

Ácido acético: AA

Amilorida: AM

$A_{nm}$ : absorvância no comprimento de onda especificado

ATCC: American Type Culture Collection

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

cm: centímetros

CAA: Células Apresentadoras de Antígenos

Citocalasina D: CD

Cov : repressor de genes de virulência (de *control of virulence*)

DMSO: Dimetil sulfóxido

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

SFB: Soro Fetal Bovino

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

Gbps: proteínas ligantes de glucano (de *Glucan-binding proteins*)

*gtfs*: genes glucosiltransferases

Gtfs: proteínas glucosiltransferases

h: horas

l: litros

Ig: Imunoglobulina

IL: interleucina

mM: milimolar

M: Molar

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MHCII: Complexo de Histocompatibilidade Principal classe II (de *Major Histocompatibility Complex*)

min: minuto

ml: mililitro

MO: Microscópio Óptico

Monodansilcadaverina: MV

MSA: Mitis Salivarius Agar

n: número

NO: óxido nítrico

O<sup>2-</sup>: ânion superóxido

pH: potencial hidrogênico

PBS: Solução salina tamponada (de *Phosphate-buffered saline*)

PMN: Polimorfonucleares

*S. mutans*: *Streptococcus mutans*

s: segundo

SDC: Sistemas de Dois Componentes

SFB: Soro Fetal Bovino

TN: Thais Negrini

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$

$\mu$ g: micrograma

$\mu$ M: micromolar

$\mu$ l: microlitro

Vic: indutor de genes de virulência (de *virulence of control*)

## LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1.** Procedimento de inoculação de 3ml de tioglicolato de sódio (3%) na cavidade peritoneal de camundongos Balb/c.....**25**
- Figura 2.** Etapas da coleta de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c previamente inoculados com solução de tioglicolato de sódio a 3%. **A e B** Exposição da cavidade peritoneal. **C.** Inoculação de 5ml de PBS gelado. **D.** Massagem da cavidade peritoneal. **E.** Aspiração do líquido intraperitoneal contendo macrófagos elicitados. **F.** Manutenção dos tubos com *pool* de macrófagos peritoneais em banho de gelo.....**26**
- Figura 3.** Etapas para a determinação do número de macrófagos peritoneais das amostras coletadas de camundongos. **A.** Diluição 10x em PBS pH7,4. **B.** Diluição 10x em Líquido de Lázarus. **C.** Distribuição da amostra diluída em Câmara de Neubauer. **D.** Contagem das células em microscópio óptico para posterior ajuste do número de macrófagos por ensaio em lâminas de cultura.....**27**
- Figura 4.** **A.** Preparo da suspensão de macrófagos peritoneais em meio RPMI com 10% SFB para um total de 400.000 macrófagos por ml de meio. **B.** Distribuição de 500µl de suspensão/poço em lâminas de cultura Lab Tek. **C.** Incubação das lâminas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> por 2 horas, para a formação de monocamada de macrófagos aderentes.....**28**
- Figura 5.** **A.** Cadeias de *S. mutans* localizadas no interior dos macrófagos (setas contínuas). **B.** A seta tracejada indica internalização de coco isolado. Observar aglomerado de bactérias internalizadas (seta

dupla) e emissão de pseudópodes por macrófagos para o processo de internalização (seta contínua).....34

**Figura 6.** Eficiência de internalização de 11 cepas distintas (UA159, 5ST1, 8VS3, 10ST3, 8ID3, UA130, 1JP2, 3A1, 20A3, 5SM3 e SJ32) de *S. mutans* por macrófagos murinos peritoneais, após período de 5 minutos de contato. Os valores das colunas correspondem às médias de macrófagos com bactérias internalizadas (um total de 500 macrófagos analisados), obtidas a partir dos valores de três experimentos independentes. As barras sobre as colunas indicam os desvios padrão.....36

**Figura 7.** Comparação das curvas de internalização de 11 cepas de *S. mutans* por macrófagos murinos. Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes. Verifica-se que a cepa SJ32, em relação às outras cepas, foi a mais internalizada por macrófagos nos tempos de 5, 15 e 60min (Mann-Whitney U test ,  $p < 0,01$ ).....37

**Figura 8.** Comparação da eficiência de internalização das cepas *S. mutans* selvagem UA159, mutante *vicH-* e mutante *covR-*, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. As colunas representam as médias de macrófagos com bactérias internalizadas (de um total de 500 macrófagos analisados), obtidas de três experimentos independentes; colchetes indicam os desvios padrão.....38

**Figura 9.** Comparação da eficiência de internalização das cepas *S. mutans* selvagem LT11, mutante *vicH-* e mutante *covR-*, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. As colunas representam as médias de macrófagos com bactérias internalizadas (de um total de 500 macrófagos analisados) obtidas de três experimentos independentes; colchetes indicam os desvios padrão.....39

**Figura 10.** Comparação da eficiência de internalização da cepa de *S. mutans* UA159, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c quando tratados com Citocalasina D a 10 $\mu$ M. As colunas

representam as médias de macrófagos com bactérias internalizadas (de um total de 500 macrófagos analisados), durante o período de 5min, obtidas de três experimentos independentes; colchetes indicam os desvios padrão.....40

**Figura 11.** Comparação da eficiência de internalização da cepa de *S. mutans* UA159, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c tratados com Amilorida em diferentes concentrações ( $\mu\text{M}$ ). As colunas representam as médias de macrófagos com bactérias internalizadas (de um total de 500 macrófagos analisados), durante o período de 5min, obtidas de três experimentos independentes; colchetes indicam os desvios padrão.....41

**Figura 12.** Comparação da eficiência de internalização da cepa de *S. mutans* UA159, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c tratados com Monodansicadaverina a  $150\mu\text{M}$ . As colunas representam as médias de macrófagos com bactérias internalizadas (de um total de 500 macrófagos analisados), durante o período de 5min, obtidas de três experimentos independentes; colchetes indicam os desvios padrão.....42

**Figura 13.** Aspecto da não internalização *S. mutans* por macrófagos murinos (Giemsa, 100x) tratados com o inibidor CD a  $10\mu\text{M}$ . **A.** Observar a presença de coco isolado (seta) adjacente ao citoplasma dos macrófagos. **B.** Aglomerado de bactérias localizado externamente ao citoplasma macrofágico (seta). **C.** Macrófago com cadeia de estreptococos não internalizada (seta).....43

**Figura 14.** Aspectos representativos das bactérias no interior de macrófagos peritoneais. **A.** Bactéria internalizada, possivelmente, por fagocitose ou endocitose mediada por clatrina, pois não há espaço entre a membrana e a bactéria englobada. **B.** Grande número de bactérias internalizadas (setas). **C.** Maior aumento da Figura B indicando espaço entre a membrana e bactéria internalizada

sugerindo internalização por macropinocitose (seta). Indicação das barras: A = 0,54 $\mu$ m, B = 0,86 $\mu$ m, C = 0,30  $\mu$ m.....45

**Figura 15.** Aspectos representativos dos macrófagos expostos a bactérias após tratamento com os inibidores CD (A), AM (B) ou MV (C). As setas indicam bactérias localizadas externamente à célula macrofágica. Indicação das barras: A= 0,86 $\mu$ m, B= 0,58 $\mu$ m, C = 0,86 $\mu$ m.....46

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. <i>Streptococcus mutans</i> e seus fatores de virulência.....	3
2.2. A resposta imunológica contra patógenos.....	6
2.2.1. Sistema imunológico de mucosas e seu efeito no estabelecimento de <i>S. mutans</i> na cavidade bucal.....	8
2.3. Mecanismos de internalização bacteriana por CAA.....	10
2.3.1. Macrófagos.....	10
2.3.2. A importância do citoesqueleto nos mecanismos de internalização de antígenos..	12
2.3.2.1. Endocitose mediada por clatrina.....	13
2.3.2.2. Fagocitose.....	13
2.3.2.3. Macropinocitose.....	14
<b>3. PROPOSIÇÃO</b> .....	15
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	16
4.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento.....	16
4.2. Linhagens de células macrofágicas e condições de cultura.....	17
4.3. Ensaio de internalização de cepas variáveis quanto à produção de GbpB.....	22
4.4. Ensaio de internalização dos mutantes knock-out <i>cov</i> e <i>vic</i> e respectivas cepas selvagens.....	23
4.5. Ensaio com os inibidores dos processos de internalização Citocalasina D, Amilorida e Monodansicadaverina.....	24
4.6. Análises de bactérias internalizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	26
<b>5. RESULTADOS</b> .....	27
5.1. Aspecto da internalização de <i>S. mutans</i> por macrófagos peritoneais em microscopia óptica (MO).....	27
5.2. Eficiência de internalização das cepas de <i>S. mutans</i> variantes quanto à produção de GbpB por macrófagos murinos.....	29
5.3. Efeito da inativação de <i>cov</i> e <i>vic</i> na internalização de <i>S. mutans</i> por macrófagos murinos.....	31
5.4. Determinação dos mecanismos de internalização bacteriana por macrófagos em ensaios com inibidores.....	33
5.5. Análises de bactérias internalizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	38

<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
<b>ANEXOS</b> .....	64

## 1. INTRODUÇÃO

*Streptococcus mutans* é o principal patógeno da cárie dentária, pois apresenta a capacidade de se aderir, acumular no biofilme dentário, produzir e tolerar condições altamente acidogênicas, as quais promovem a desmineralização dos dentes. Três grupos de antígenos (Ags) destes microrganismos têm sido amplamente estudados, pois participam do processo de aderência e acúmulo de *S. mutans* no biofilme dentário. Estes incluem a adesina antígeno I/II (Ag I/II), as glucosiltransferases (Gtfs) e as proteínas ligantes de glucano (Gbp de *Glucan-binding protein*). A capacidade de acúmulo no biofilme é dependente da produção de glucosiltransferases (Gtfs), as quais catalisam a síntese de glucanos insolúveis a partir da sacarose (Yamashita *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1997). Além das Gtfs, *S. mutans* produzem a proteína ligante de glucano B (GbpB, de *Glucan-binding protein B*), a qual parece ser outro antígeno de virulência (Smith *et al.*, 2003). Variações na produção de GbpB estão associadas às diferenças na capacidade de formação de biofilme *in vitro* entre genótipos distintos de *S. mutans* (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). Além disto, a imunização de ratos com GbpB induz a produção de anticorpos IgG e IgA específicos, o que é capaz de conferir proteção contra a cárie dentária, mesmo sob alta exposição à sacarose (Smith & Taubman, 1996; Smith *et al.*, 2004). Estudos recentes indicam que crianças com altos níveis de anticorpos salivares IgA anti-GbpB são significativamente menos susceptíveis à infecção bucal por *S. mutans* durante os primeiros anos de vida, quando comparadas a crianças que não apresentam IgA salivar contra esta proteína (Nogueira *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2007). As razões que determinam o padrão de resposta de anticorpos contra a GbpB são ainda pouco compreendidos.

As células apresentadoras de antígeno (CAA), as quais incluem os macrófagos, células dendríticas e células B, desempenham um papel fundamental na geração de resposta antígeno-específica, pois são responsáveis pela captação de patógenos, processamento dos mesmos e apresentação de peptídeos derivados em complexos com moléculas MHCII aos linfócitos T<sub>H</sub>. É possível que as CAA de indivíduos mais susceptíveis à infecção por *S. mutans* apresentem

epítomos de GbpB imunologicamente ou funcionalmente menos relevantes para a ativação de linfócitos T auxiliares (Ta) (Smith *et al.*, 2003; Nogueira *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2007). Os mecanismos de internalização e processamento de um patógeno por CAA parecem influenciar no padrão de epítomos apresentados em complexos com MHCII (Delwig *et al.*, 1998; von Delwig *et al.*, 2002).

Existem diversos mecanismos distintos independentes de opsoninas, através dos quais, as CAA internalizam patógenos/antígenos para seu processamento. As três vias conhecidas de internalização de antígenos por macrófagos são fagocitose, macropinocitose e endocitose mediada por clatrina (von Delwig *et al.*, 2002). Estudos analisando os padrões de epítomos apresentados, após processamento da proteína M5 de *Streptococcus pyogenes* têm indicado que, enquanto um epítomo M5 é predominantemente apresentado após a fagocitose bacteriana, um segundo epítomo distinto é mais apresentado quando a internalização desta bactéria ocorre por macropinocitose (von Delwig *et al.*, 2002). As próprias características de genótipos bacterianos distintos podem influenciar no processo de captação por fagócitos. Por exemplo, variações no padrão de glicoproteínas da superfície celular entre os sorotipos distintos de *S. mutans* estão associados às variações na susceptibilidade à fagocitose por neutrófilos (Nakano *et al.*, 2004). Há evidências de que variações no padrão de proteínas associadas à parede celular de outras espécies de estreptococos (por exemplo, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus suis*) influenciam na susceptibilidade de cepas distintas a internalização por macrófagos (Segura *et al.*, 1998).

Estudos recentes têm ainda demonstrado que o padrão de expressão de antígenos de superfície reconhecidos por fagócitos é controlado por sistemas de dois componentes (SDC) em espécies relacionadas à *S. mutans* como *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae* (Voyich *et al.*, 2004; Lei *et al.*, 2001). Os SDC parecem ser essenciais para a adaptação e sobrevivência bacteriana aos micro-ambientes do hospedeiro e para a virulência, uma vez que os colonizadores mais agressivos são capazes de responder eficientemente às

condições de estresse ambiental, incluindo-se o contato com células de defesa do hospedeiro (Stock *et al.*, 2000). O estudo da influência da inativação destes dois SDC na eficiência de internalização bacteriana por macrófagos poderá contribuir para a compreensão do papel destes sistemas na susceptibilidade de *Streptococcus mutans* a células de defesa. A análise dos mecanismos de internalização de *S. mutans* por macrófagos murinos (células apresentadoras de antígenos) poderá ainda auxiliar na compreensão dos fatores determinantes do padrão de resposta imune adaptativa a estes microrganismos.

O objetivo do presente estudo é investigar o padrão de internalização opsonina-independente de cepas *Streptococcus mutans* que variam na produção de componentes de superfície.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA.**

### **2.1. *Streptococcus mutans* e seus fatores de virulência.**

*Streptococcus mutans* apresenta diversos fatores de virulência que os tornam capazes de colonizar, acumular-se na superfície dentária na presença de sacarose e adaptar-se a diversas condições de estresse presentes no biofilme cariogênico, como as quedas bruscas de pH decorrentes do metabolismo fermentativo bacteriano (Kuramitsu, 2001; Mattos-Graner & Smith, 2005). Estes fatores de virulência incluem adesinas de superfície, glucosiltransferases, proteínas ligantes de glucano e diversas proteínas produzidas em resposta a estímulos de estresse ambiental, através da ativação de sistemas de transcrição de dois componentes (SDC) (Banas e Vickerman, 2003, Burne, 1998).

O início da fase de colonização dentária depende da ligação bacteriana, através de suas adesinas, a receptores pré-existent na superfície dentária (proteínas e glicoproteínas de origem salivar e microbiana formando a película adquirida do esmalte dental) (Kolenbrander *et al.*, 2006). Algumas espécies de estreptococos bucais apresentam adesinas de alta afinidade a componentes da película adquirida com *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguinis* sendo, portanto, considerados como colonizadores primários dos

dentos. *Streptococcus mutans* apresenta adesinas de menor afinidade à película adquirida, não sendo considerado um bom colonizador primário (Kolenbrander *et al.*, 2006), mas também pode ligar-se especificamente a componentes da película adquirida e/ou da superfície de outras bactérias.

O acúmulo de *S. mutans* no biofilme dentário é favorecido pela presença de sacarose da dieta, pois estes microrganismos produzem glucosiltransferases (Gtfs), as quais sintetizam várias formas de glucanos extracelulares de alto peso molecular (Banas & Vickerman, 2003). A interação deste glucanos com a superfície de *S. mutans* é pouco compreendida, mas parece envolver diversas proteínas ligantes de glucanos (Gbps, de Glucan-binding proteins). *Streptococcus mutans* expressam pelos menos quatro Gbps distintas, GbpA, GbpB, GbpC e GbpD (Banas & Vickerman, 2003). Estas compreendem um grupo heterogêneo de proteínas, as quais podem ser secretadas ou associadas às superfícies celulares (Banas & Vickerman, 2003).

Além dos mecanismos de adesão e acúmulo no biofilme dentário, *S. mutans* é capaz de adaptar-se a diversas condições de estresse ambiental presentes no biofilme cariogênico, como as quedas bruscas de pH, grandes variações na disponibilidade de nutrientes, condições osmóticas e oxidativas. Estudos demonstram que a habilidade de adaptação a estas condições envolve a ativação ou repressão de diversos genes regulados por sistemas de transcrição de dois componentes (SDC) (Stock *et al.*, 2000), cerca de 4000 SDCs foram identificados em 145 genomas bacterianos, isso demonstra a importância desses sistemas na adaptação desses microrganismos às condições do ambiente (Ulrich *et al.*, 2005). Os SDC são tipicamente compostos por: 1) uma histidina quinase de membrana e 2) um regulador de resposta intracelular. Ao reconhecer um sinal extracelular (ou condição ambiental específica), a histidina quinase de superfície se auto-fosforila, e transfere o grupo fosfato ao seu regulador de resposta intracelular, o qual muda de conformação para se ligar às seqüências regulatórias de genes alvos, ativando ou inibindo sua expressão (revisado por Stock *et al.*, 2000).

Em *S. mutans*, foram encontrados 13 prováveis SDC (Ajdic *et al.*, 2002), os quais vêm sendo recentemente caracterizados através de mutantes *knock-out* em cepas laboratoriais. O SDC *CovR/S* foi bem caracterizado em outras espécies de estreptococos, sendo descrito como participante na regulação negativa da expressão de vários genes de virulência. Na espécie *Streptococcus pyogenes*, o sistema *Cov* regula a expressão de cerca de 15% dos genes, muito deles envolvidos na patogênese (Graham *et al.*, 2002), enquanto que na espécie *Streptococcus agalactiae* este sistema controla pelo menos 6% dos genes (Lamy *et al.*, 2004) e demonstra ser essencial para a virulência (Jiang *et al.*, 2005). Em *S. mutans*, pouco se sabe sobre os possíveis genes que estão sob controle do regulador *covR*, enquanto que o ortólogo *CovS*, o qual codifica a histidina de membrana, não foi identificado no genoma do genótipo de *S. mutans* UA159. Biswas & Biswas (2006) demonstrou que mutantes *knock-out* de *covR* apresentaram aumento na expressão de *gtfB* e *gtfC*, sugerindo uma função repressora por esse regulador.

O SDC *vicR/H* também foi detectado em *S. mutans* e parece regular a expressão dos genes de virulência *gtfB*, *gtfC* e *gbpB*, uma vez que o mutante *vicH-* demonstrou redução na expressão destes genes e produção de um biofilme de estrutura anormal. Os resultados sugeriram que *vicR* pode participar na ativação da transcrição de *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* e *gbpB*, uma vez que, nestes ensaios, a transcrição desses genes foi aumentada para *gtfs* e *gbpB* (Senadheera *et al.*, 2005). *VicR* é essencial, ou seja, não pode ser inativado em *Bacillus subtilis* (Fabret & Hoch, 1998), *Staphylococcus aureus* (Martin *et al.*, 1999) e *Streptococcus pneumoniae* (Throup *et al.*, 2000). *VicH* também é essencial *B. subtilis*, mas não em *S. pneumoniae* e *S. mutans* (Fabret & Hoch, 1998; Echenique & Trombe, 2001; Senadheera *et al.*, 2005). Liu *et al.* (2006) verificou que a mutante *vicR-* de *Streptococcus pyogenes* apresentou atividade anti-fagocítica não sendo eficientemente morta por PMNs humanos. Esses resultados sugerem que a regulação por *vicR/H* está envolvida no processo de evasão de microrganismos e mecanismos de defesa do hospedeiro e, também, no

crescimento bacteriano). Em *Streptococcus pyogenes*, por exemplo, a inativação de *vicR* parece não interferir no reconhecimento por fagócitos, embora afete a expressão da proteína extracelular PcsB (Liu *et al.*, 2006), a qual é altamente homóloga a GbpB (Mattos-Graner *et al.*, 2001a). Na mesma espécie, o mutante *covR*- é menos internalizado por células epiteliais, provavelmente por este sistema modular a expressão de proteínas envolvidas na síntese de cápsula de polissacarídeos (Jadoun & Sela, 2000). O SDC *covRS* parece ser importante na virulência de *S. pyogenes*, uma vez que cepas com mutações espontâneas neste sistema estão associadas a manifestações mais invasivas em humanos, quando comparada ao tipo selvagem (Sumbly *et al.*, 2006).

Embora claro o papel de *S. mutans* como principal patógeno da cárie dentária, não há estudos que avaliem o papel de seus SDC Vic e Cov no reconhecimento e internalização por células do sistema imune inato. Portanto, estudos são necessários para compreensão da influência destes sistemas na susceptibilidade de *S. mutans* aos componentes do sistema de defesa do hospedeiro.

## **2.2. A resposta imunológica contra patógenos.**

Sabe-se que o local e o tipo de patógeno determinam o tipo de resposta imune a ser ativada (Parham, 2001). Os componentes do sistema imunológico são classificados em duas categorias o sistema imune inato (inespecífico) e o sistema imune adaptativo (específico) (Janeway & Medzhitov, 2002; Azuma, 2006). O sistema imune inato compreende os componentes que atuam na primeira linha de defesa impedindo a entrada de patógenos nos tecidos. Estes incluem as barreiras epiteliais e diversos componentes químicos de defesa, além de células fagocíticas. Componentes do sistema imune inato também ativam a resposta imune adaptativa antígeno-específica (Janeway & Medzhitov, 2002; Azuma, 2006).

A resposta imune adaptativa inclui os linfócitos T e B além dos anticorpos. Os linfócitos T auxiliares são ativados ao reconhecerem antígenos

apresentados em complexos com moléculas MHC (major histocompatibility complex) de classe II em células apresentadoras de antígenos (CAA). Assim, na geração da resposta imune adaptativa a patógenos bacterianos, as CAA, desempenham um papel fundamental na internalização de patógenos, processamento dos mesmos e apresentação de peptídeos derivados em complexos com moléculas MHC de classe II (revisado por Fearon & Locksley, 1996). Proteínas bacterianas imunodominantes parecem conter peptídeos preferencialmente apresentados em moléculas MHCII. Análises de bioinformática da seqüência de GbpB revelaram diversas porções peptídicas com alta afinidade a alelos distintos de MHCII de humanos (Smith *et al.*, 2003). Entretanto, o processo de imunodominância da GbpB ainda não é totalmente compreendido. Variações nos componentes da superfície bacteriana influenciam no processo de reconhecimento e internalização por células do sistema imune inato (Nakano *et al.*, 2004). Nakano *et al.* (2004), estudando cepas de pacientes com endocardite, verificou que a cepa sorotipo *K* foi a mais encontrada na placa dental dos indivíduos analisados, sendo que essa apresentou altos níveis de hidrofobicidade celular, aderência dependente de sacarose e baixos níveis de fagocitose (opsonina-independente) por neutrófilos. Valentin-Weigand *et al.*, 1996, verificou que estreptococos grupo B são capazes de sobreviver por um longo período no interior dos macrófagos após serem internalizados. Um longo período de sobrevivência em macrófagos também foi observado com *Streptococcus suis* (Wilemann *et al.*, 1985) Esta sobrevivência pode ocorrer devido à inibição de formação do fagolisossomo por esse microrganismo (Valentin-Weigand *et al.*, 1996). Padrões de epítomos apresentados, após processamento da proteína M5 de *Streptococcus pyogenes* têm indicado que, enquanto um epítomo M5 é predominantemente apresentado após a fagocitose bacteriana, um segundo epítomo distinto é mais apresentado quando a internalização desta bactéria ocorre por macropinocitose (von Delwig *et al.*, 2002).

### **2.2.1. Sistema imunológico de mucosas e seu efeito no estabelecimento de *S. mutans* na cavidade bucal.**

O sistema imune de mucosas é composto por tecidos linfóides associados às superfícies mucosas dos tratos gastrintestinal, respiratório e urogenital. A principal função deste sistema é o de defesa das superfícies mucosas contra antígenos alimentares, toxinas e invasão de microrganismos (bactérias, fungos, vírus e parasitas) (Strober & James, 1994). A primeira linha de defesa adaptativa das superfícies mucosas é representada pelas Imunoglobulinas IgA secretora (IgAS), que estão presentes nas secreções, em cooperação com mecanismos inatos protetores, tais como mucinas, aglutininas, outras proteínas de defesa (por exemplo, lactoferrina, lisozima, defensinas) e células (neutrófilos e macrófagos).

A indução da resposta de IgAS salivar contra antígenos de virulência de *S. mutans* é uma estratégia interessante para controle da cárie dentária. Os primeiros estudos clínicos de vacina anti-*S. mutans* foram realizados em adultos e crianças americanas revelando o potencial para indução de anticorpos IgA protetores contra *S. mutans* (Smith *et al.*, 2002, Childers *et al.*, 2002). Os estudos nesta área foram realizados em populações com baixos índices de cárie e baixa frequência de infecção por *S. mutans* e sugeriram que as crianças somente desenvolvem um padrão mais complexo de resposta imune adaptativa a antígenos de *S. mutans*, a partir dos 2 anos de idade, quando os níveis destas bactérias foram detectáveis na cavidade bucal (Smith *et al.*, 1998; Cole *et al.*, 1999). Embora estudos sugiram que a redução do risco de colonização bucal por *S. mutans* ocorre após 2,5 anos de idade devido ao estabelecimento de uma microbiota comensal competitiva nas superfícies dentárias recém-irrompidas (Caufield *et al.*, 1993; Caufield *et al.*, 2000), pouco se sabe sobre o papel da maturação do sistema imune de mucosas no estabelecimento de *S. mutans* na cavidade bucal. Recentemente, foi demonstrado que a GbpB é imunologicamente dominante nos primeiros doze meses de vida em grande proporção de crianças (Nogueira *et al.*, 2005). Além disto, a intensidade da resposta de IgA salivar a este

antígeno foi associada à susceptibilidade de infecção inicial por *S. mutans* (Nogueira *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2007). No estudo de Nogueira *et al.* (2005), apenas 36% das crianças precocemente infectadas por *S. mutans* (entre 6 e 21 meses de idade) apresentaram resposta de IgA a este antígeno, enquanto que 76% das crianças não infectadas (da mesma população, idade, sexo, padrão racial, número de dentes irrompidos, consumo de sacarose e níveis totais de IgA salivar) apresentaram resposta de IgA à GbpB durante os primeiros 24 meses de idade (Nogueira *et al.*, 2005). Durante os primeiros 6 a 12 meses de idade, anticorpos IgA GbpB-reativos constituíram pelo menos metade do total de anticorpos IgA *S. mutans*-reativos salivares em 33,3% e 9,5% das crianças não infectadas e infectadas, respectivamente (Nogueira *et al.*, 2005).

Na cavidade bucal, a glândula salivar parótida produz IgA secretória que atinge a cavidade bucal, principalmente através do fluido crevicular (exsudato plasmático do sulco gengival) (Brandtzaeg, 1989). Os plasmócitos produtores de IgA são provenientes de células B estimuladas nos tecidos linfóides associados às mucosas (MALT, de Mucosal Associated Lymphoid Tissue), dos quais fazem parte os tecidos linfóides da lâmina própria do trato gastro-intestinal (GALT, de Gut Associated Lymphoid Tissue), trato respiratório, trato genito-urinário e tonsilas linguais, palatinas e faríngeas (Roitt & Lehner, 1983). O GALT contém, além dos tecidos linfóides, agregados nodulares junto à parede intestinal denominados Placas de Peyer (Brandtzaeg, 1995). Placas de Peyer e tecidos linfóides diferem morfológicamente, pois os primeiros recebem os antígenos via epitélio, enquanto que os últimos entram em contato com antígenos através das circulações linfática e sanguínea (Strober & James, 1984). O epitélio da mucosa contém células especializadas, denominadas células M, que são responsáveis por capturar e transportar o antígeno para a região subepitelial das placas de Peyer e de outros agregados linfóides da mucosa. Nestas áreas, o antígeno é processado por macrófagos, que por sua vez o apresentam a células T e B (Brandtzaeg, 1995).

Há pouca informação sobre a organização dos tecidos linfóides associados à mucosa bucal. Kutta *et al.* (2006), analisando 23 ductos de

glândulas parótidas, através de ensaios histológicos, histoquímicos e imunohistoquímicos, demonstrou macrófagos distribuídos na lâmina própria e no tecido conjuntivo subepitelial da cavidade bucal. Além disso, os macrófagos estão presentes no fluido gengival crevicular e, juntamente com neutrófilos, funcionam na defesa do organismo, principalmente em processos patológicos gengivais (Delima & Dyke, 2003, Metzger, 2000). Os macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de animais são usualmente utilizados em estudos sobre os mecanismos de reconhecimento, captação e processamento de antígenos e apresentação dos mesmos para linfócitos. Estes macrófagos podem ser classificados em três grupos que refletem seus estados funcionais: (1) macrófagos residentes, que são derivados da cavidade peritoneal sem nenhum estímulo, presentes em órgão ou tecidos não inflamatórios; (2) macrófagos elicitados, populações que se acumulam em um determinado local devido a estímulos específicos, como o tioglicolato de sódio; e os (3) macrófagos ativados, recrutados para a cavidade por uma infecção (Cohn, 1978; Crawford *et al.*, 1987). Cada um destes estágios é acompanhado pela expressão específica de proteínas de membrana e produtos de secreção (Mackay & Russell, 1986). O termo “macrófago ativado” geralmente refere-se a macrófagos cujas características funcionais, bioquímicas e morfológicas refletem um aumento da atividade celular. Quando comparados com macrófagos residentes, os macrófagos ativados são maiores e mais aderentes às superfícies. As células ativadas demonstram aumento da expressão e secreção de enzimas lisossomais e de fatores de crescimento (Kaminski *et al.*, 1985).

### **2.3. Mecanismos de internalização bacteriana por CAA.**

#### **2.3.1. Macrófagos.**

Os macrófagos são células do grupo dos fagócitos mononucleares, os quais atuam como CAA. Os precursores destas células estão presentes no sangue e são denominados de monócitos. Amplamente distribuídos pelo corpo, os macrófagos são responsáveis por numerosos processos imunológicos e

inflamatórios constituindo uma defesa imediata contra elementos estranhos ao organismo. Algumas localizações particulares destas células incluem órgãos como baço, fígado (células de Kupffer), pulmão e nódulos linfóides. Na pele são chamados de células de Langerhans, possuindo características funcionais específicas em cada local (Adams, 1979; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Os macrófagos estão intimamente envolvidos na resposta imune. As principais funções destas células estão relacionadas ao processo inflamatório, ao processamento e apresentação dos antígenos, à ativação de linfócitos T e B, à capacidade fagocítica, ao processo de hematopoiese e de reparo tecidual, além da atividade citotóxica contra células tumorais e microrganismos (Wing & Remington, 1980; Cavaillon, 1994; Popov, *et al.*, 1999; Vadivello *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2001). Quando a fagocitose ocorre, os macrófagos englobam partículas como bactérias, leveduras, células tumorais e células senescentes e, para eliminar essas partículas ingeridas, eles produzem espécies derivadas de oxigênio e nitrogênio (Marcinkiewicz, 1997; Aderem & Underhill, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999). Uma vez que os fagócitos agem como células regulatórias e efetoras do sistema imune, o aumento da função fagocítica pode ser aplicado como terapia contra infecções bacterianas e no tratamento de câncer (Popov *et al.*, 1999).

Além das funções descritas, os macrófagos secretam moléculas sinalizadoras chamadas citocinas e quimiocinas, as quais dirigem a resposta imune (Abbas *et al.*, 2000; Taylor *et al.*, 2005). A capacidade dos macrófagos em produzir citocinas depende do grau de maturação, ativação e localização destas células (Cavaillon, 1994). As citocinas, como por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-12 dentre outras, são importantes porque permitem a comunicação entre células do sistema imune via receptores específicos presentes nas superfícies celulares (Abbas *et al.*, 2000, Smith *et al.*, 2005). Vários componentes de bactérias, como endotoxinas, exotoxinas e peptidoglicanas, são capazes de induzir a produção de citocinas por macrófagos. Além da produção de citocinas, os macrófagos ativados desencadeiam a síntese de espécies reativas do oxigênio

(ânion superóxido,  $O_2^-$ ) e a produção de óxido nítrico (NO), repostas bioquímicas de duas vias oxidativas diferentes, através dos quais os macrófagos ativado matam microrganismos e células tumorais (Macmicking *et al.*, 1997).

### **2.3.2. A importância do citoesqueleto nos mecanismos de internalização de antígenos.**

O citoesqueleto é uma estrutura dinâmica que desempenha um papel essencial em diversas funções celulares, como motilidade, modificação da morfologia celular e internalização de partículas e microrganismos (Steele-Mortimer *et al.*; 2000). Esta estrutura é formada por filamentos de actina (aproximadamente 7nm em diâmetro), microtúbulos (aproximadamente 25nm em diâmetro), e uma variedade de filamentos intermediários (aproximadamente 10nm em diâmetro) que são estáveis e exercem somente papel de sustentação não participando dos movimentos celulares.

Os filamentos de actina são formados por duas cadeias em espiral de monômeros globosos da proteína actina G que se polimerizam formando uma estrutura fibrosa (actina F) semelhante a dois colares de pérola entrelaçados. Estes filamentos participam do córtex celular (camada imediatamente interna à membrana plasmática), tendo a função de impulsionar os movimentos da célula, como por exemplo, a fagocitose. A droga Citocalasina D, extraída de fungos, liga-se aos monômeros de actina, impedindo a polimerização destes e a formação de filamentos (Welch & Mullins, 2002). A alta plasticidade do citoesqueleto é explorada freqüentemente por patógenos intracelulares durante a entrada em células que são, normalmente, não-fagocíticas (Dramsai *et al.*; 1998).

Por todas as funções de motilidade e sustentação da membrana citoplasmática, o citoesqueleto participa de diversos processos de internalização de antígenos, incluindo-se a endocitose, fagocitose e macropinocitose.

### **2.3.2.1. Endocitose mediada por clatrina.**

Endocitose é um processo pelo qual as células interiorizam porções de membrana citoplasmática, incluindo proteínas associadas e uma porção do espaço extracelular. A endocitose ocorre em todas as células eucarióticas e é a rota pela qual absorvem nutrientes, reciclam proteínas de membrana e lipídios, recebem alguns sinais químicos e moleculares extracelulares (Baggett *et al.*; 2001). Todas as células eucarióticas exibem uma ou mais formas de endocitose. Em células de mamíferos, por exemplo, a endocitose ocorre por vários caminhos distintos (Mellman, 1996), os quais incluem a formação de vesículas recobertas por clatrina, uma proteína multimérica formada por três grandes e três pequenas cadeias peptídicas que, juntas, formam uma estrutura de três pernas denominada trisquelion, os quais se estruturam em uma rede complexa e convexa de hexágonos e pentágonos semelhantes a um cesto (Ungewickell & Branton, 1981). Este processo é inibido por Monodansicadaverina (Navarro-Garcia *et al.*, 2007; von Delwig *et al.*, 2002), uma substância que bloqueia a transglutaminase, proteína que estabiliza as ligações de receptores de superfície à cápsula de clatrina (Levitzki *et al.*, 1980, Goldstein *et al.*, 1979). Diversos gêneros bacterianos podem ser internalizados por este processo: *Streptococcus pyogenes* (von Delwig *et al.*, 2002), *Chlamydia* spp. (Hodinka *et al.*, 1988), *Ehrlichia risticii* (Rikihisa *et al.*, 1994). Além disso, produtos bacterianos podem ser internalizados por esse processo, como acontece com a enterotoxina liberada pelo *Vibrio cholerae* (Broeck *et al.*, 2007).

### **2.3.2.2. Fagocitose.**

A fagocitose envolve a entrada de partículas grandes, tipicamente  $\geq 0,5\mu\text{m}$ , inclusive células que sofreram apoptose e microrganismos (Jutras & Desjardins, 2005). Em mamíferos, a fagocitose comumente envolve receptores para porção Fc dos anticorpos e para o complemento, os quais facilitam o engolfamento das partículas opsonizadas (Swason & Hoppe, 2004). Além disso, a fagocitose pode ocorrer independentemente da presença de opsoninas, através

de receptores para componentes comuns de diferentes microrganismos, os receptores “Toll-like” (Draper *et al.*, 2006). Este processo de internalização também envolve um processo dinâmico de rearranjo do citoesqueleto acompanhado por remodelamento de superfície celular, formação de pseudópodes, o que conduz à formação dos fagossomos, estruturas que contém o microrganismo englobado. Assim, a fagocitose pode ser inibida por Citocalasina (von Delwig *et al.*, 2002), substância que inibe a polimerização dos filamentos de actina, ou seja, inibe a adição das subunidades monoméricas na extremidade de rápida polimerização dos filamentos de actina (Cooper, 1987). Portanto, a CD interfere tanto na fagocitose quanto na macropinocitose e na endocitose mediada por clatrina, pois todos estes processos apresentam o envolvimento de actina (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003).

Diversos processos subsequentes à fagocitose ativam sistemas de destruição no interior dos fagossomos através de enzimas hidrolíticas e compostos oxidativos altamente tóxicos (Silverstein, 2003). Estudos indicam que cepas de uma mesma espécie variam quanto à susceptibilidade de internalização por fagócitos. Por exemplo, cepas de *S. mutans* envolvidas em endocardite bacterianas são menos eficientemente internalizadas por neutrófilos, o que parece estar associada a diferenças na composição de parede celular em comparação com cepas menos invasivas (Nakano *et al.*, 2004).

### **2.3.2.3. Macropinocitose.**

A macropinocitose envolve o englobamento de vesículas maiores que 0,2µm em diâmetro (Araki *et al.*, 2005). A macropinocitose difere da endocitose em outros aspectos. Os macropinosomos formados durante a macropinocitose localizam-se às margens da expansão celular e são heterogêneos em tamanho, às vezes com 5µm em diâmetro (Swanson, 1989; Hewlett *et al.*; 1994). Em contraste, na endocitose, há envolvimento de clatrina, com formação de vesículas uniformes, com 85-110nm em diâmetro, devido ao revestimento por esta proteína multimérica (Bretscher & Thomson, 1983). Por outro lado, na macropinocitose não

há nenhum revestimento por capuz protéico discernível e não há envolvimento de receptores. Os macropinosomos são organelas geralmente grandes, que interiorizam solutos com fluídos, de forma não-seletiva, porém com grande eficiência para interiorizar macromoléculas (Racoosin & Swanson, 1992).

Na macropinocitose, como na fagocitose, ocorre a formação de uma projeção da membrana citoplasmática, através da polimerização de actina na forma de uma faixa linear externo-dirigida. A formação destes prolongamentos pode ser inibida tanto por Citocalasina D, a qual inibe a polimerização de actina e consequentemente a motilidade celular quanto por Amilorida, uma proteína multimérica formada por três subunidades homólogas que se rearranjam bloqueando canais de  $\text{Na}^+$  e, consequentemente, impedindo a entrada de fluídos na célula e a formação do macropinosomo (Alvarez de la Rosa *et al.*, 2000; Vandenbeuch *et al.*, 2008). Diversos gêneros bacterianos podem ser internalizados por macropinocitose incluindo bactérias Gram-negativas (ex., *Salmonella spp.*), micobactérias e estreptococos (Francis *et al.*, 1993; Lungton, 1999; Bermudez *et al.*, 2004; von Delwig *et al.*, 2002).

### 3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo é investigar o padrão de internalização opsonina-independente de cepas *Streptococcus mutans* que variam na produção de componentes de superfície. Para isto, este estudo tem os seguintes objetivos específicos:

- 1) Investigar o efeito de variações na produção de GbpB na susceptibilidade a internalização por macrófagos murinos.
- 2) Avaliar a influência da inativação dos sistemas de dois componentes, Cov e Vic, na eficiência de internalização bacteriana por macrófagos murinos.
- 3) Explorar os mecanismos opsonina-independentes pelos quais as cepas *S. mutans* são internalizadas por macrófagos murinos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Cepas bacterianas e condições de crescimento.

Um total de 10 cepas de *Streptococcus mutans*, previamente caracterizadas quanto à produção de GbpB (Mattos-Graner *et al.*, 2001b), foram avaliadas neste estudo. Entre estas, cinco apresentam a maior parte da GbpB na forma associada à superfície celular (cepas UA130, 5SM3, 8ID3, 8VS3 e 3A1), enquanto outras cinco (cepas SJ32, 20A3, 10ST3, 1JP2 e 5ST1), apresentam a maior parte da GbpB produzida livre no sobrenadante de cultura (forma secretada). As cepas 8ID3 e 3A1 são baixas produtoras de GbpB tanto na forma associada à superfície celular quanto produzida no sobrenadante (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). Além destas cepas, foi incluída no estudo a cepa UA159, como referência.

Para investigar a influência dos SDC *vic* e *cov* na susceptibilidade à fagocitose, um total de 6 cepas *S. mutans* foram avaliadas, incluindo-se a cepa selvagem UA159 e respectivos mutantes knock-out UA159 *vicH*<sup>-</sup> e UA159 *covR*<sup>-</sup>, além da cepa LT11 e respectivos mutantes (LT11 *vicH*<sup>-</sup> e LT11 *covR*<sup>-</sup>). Os mutantes knock-out foram construídos em nossos laboratórios através da substituição dos genes alvo *covR* e *vicH* por alelos mutados contendo um cassete de resistência à eritromicina (Stipp *et al.*, 2007).

Em todos os experimentos, as cepas selvagens foram reativadas a partir dos estoques congelados em meio Mitis Salivarius Ágar (MAS, Difco) e as mutantes reativadas a partir dos estoques congelados em meio MAS acrescido de eritromicina (5ug/ml) (Sigma), sendo as placas incubadas por 48h em atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub> a 37°C. No dia anterior ao experimento, 5 colônias de culturas de cada cepa em MSA (obtidas a partir de estoques congelados) foram inoculadas em tubos contendo 8 ml de meio BHI (Brain Heart Infusion) acrescidos ou não de eritromicina, para as cepas mutantes e selvagens respectivamente e incubados a 37°C, em atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub>, por 18h. Alíquotas de 100µl destas culturas foram inoculadas em 8ml de caldo BHI (com ou sem eritromicina), como descrito acima e incubadas a 37°C, em atmosfera com 10% de CO<sub>2</sub>, até

atingirem absorvância ( $A_{550nm}$ ) de 0,6 entre 5 e 8 horas de crescimento, de acordo com cada cepa. Destas culturas bacterianas, 3ml foram utilizados para o experimento de internalização.

#### **4.2. Linhagens de células macrófágicas e condições de cultura.**

Foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c obtidos, para cada experimento, de 5 camundongos machos com idade entre 6 e 8 semanas. Os macrófagos foram obtidos após injeção intraperitoneal de solução aquosa de tioglicolato de sódio a 3% nos camundongos, quatro dias antecedentes ao experimento (Figura 1). Após este período, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e, para a remoção dos macrófagos, foi realizada a exposição da cavidade peritoneal com o auxílio de pinças dente de rato, injeção intraperitoneal de 5ml de PBS (pH7,4) gelado e estéril, massagem vigorosa da cavidade (permitindo a liberação dos macrófagos aderidos ao tecido para o líquido) e a re-suspensão das células abdominais por meio de aspiração do líquido intraperitoneal. A partir do líquido removido dos 5 animais, foi obtido um *pool* de células macrófágicas para análise laboratorial (Figura 2). Em seguida, essas células foram imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Patologia em banho de gelo e centrifugadas a 8000xg por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, foi realizada a re-suspensão do pellet em 3ml de PBS gelado, centrifugação a 8000xg por 5 min, aspiração do PBS e re-suspensão do pellet em 1ml de RPMI com 100 U/ml de penicilina- estreptomicina, 1mM L- glutamina, 10% de soro fetal bovino e  $\beta$ -mercaptoetanol (Gibco).

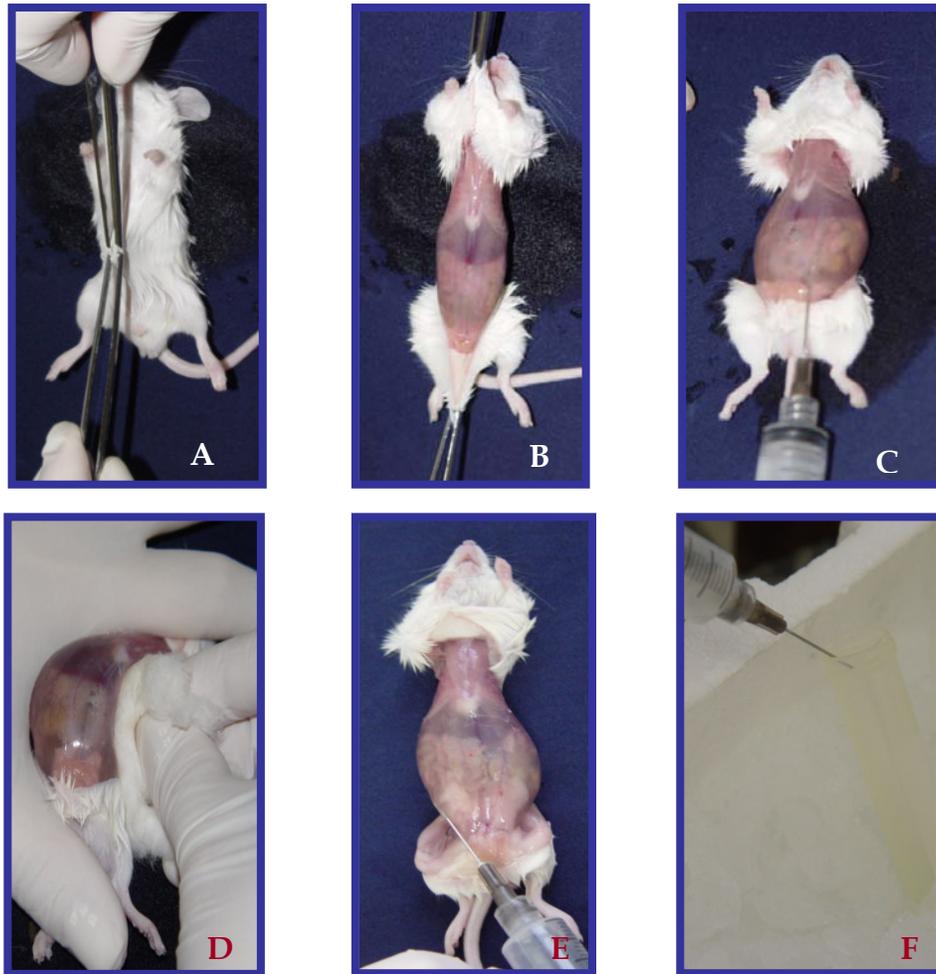
Para padronização do número de células a serem utilizadas em cada experimento, foi realizada a contagem de macrófagos com o auxílio de uma Câmara de Neubauer. Desta forma, 10 $\mu$ l da suspensão em RPMI foram diluídos em 90 $\mu$ l de PBS e, desta solução, 10 $\mu$ l foram adicionados a 90 $\mu$ l do corante Líquido de Lázarus obtido através da mistura de solução de Violeta de Genciana (Synth), ácido acético glacial (Synth) e água destilada, na proporção de: 1g/3ml/100ml, respectivamente) (Synth). A contagem do número de células foi

realizada em microscópio óptico (Diastar, Reichert, Buffalo, NY), utilizando-se o aumento de 200x (Figura 3).

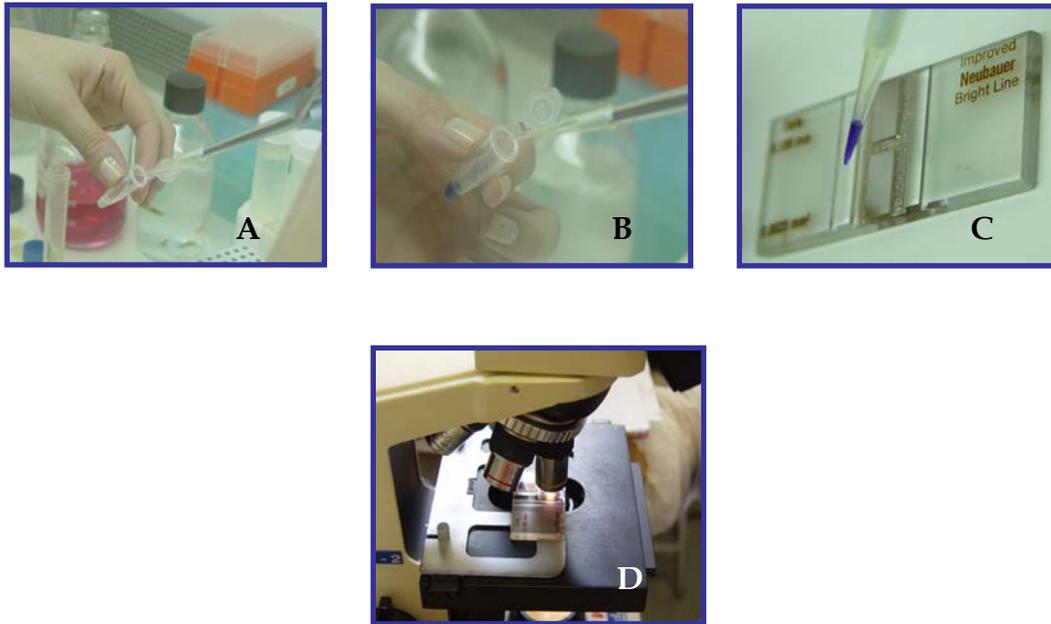
Para os ensaios de internalização, um total de 200.000 macrófagos por volume de 500µl de RPMI foram distribuídos por poço em lâminas de cultura Lab Tek (Nunc, Naperville IL) (1,8 cm<sup>2</sup>/poço). Depois da distribuição de 500µl de suspensão/poço, as lâminas foram incubadas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> (estufa ThermoForma, HEPA) por 2 horas, para a formação de uma camada única de macrófagos aderentes (Figura 4). Após esse período, essas células foram submetidas ao contato com as suspensões bacterianas.



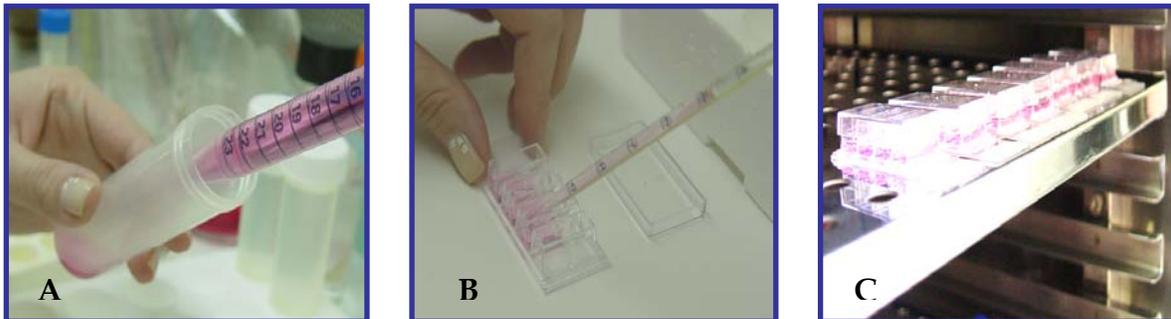
**Figura 1.** Procedimento de inoculação de 3ml de tioglicolato de sódio (3%) na cavidade peritoneal de camundongos Balb/c.



**Figura 2.** Etapas da coleta de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c previamente inoculados com solução de tioglicolato de sódio a 3%. **A e B** Exposição da cavidade peritoneal. **C.** Inoculação de 5ml de PBS gelado. **D.** Massagem da cavidade peritoneal. **E.** Aspiração do líquido intraperitoneal contendo macrófagos elicitados. **F.** Manutenção dos tubos com *pool* de macrófagos peritoneais em banho de gelo.



**Figura 3.** Etapas para a determinação do número de macrófagos peritoneais das amostras coletadas de camundongos. **A.** Diluição 10x em PBS pH7,4. **B.** Diluição 10x em Líquido de Lázarus. **C.** Distribuição da amostra diluída em Câmara de Neubauer. **D.** Contagem das células em microscópio óptico para posterior ajuste do número de macrófagos por ensaio em lâminas de cultura.



**Figura 4.** **A.** Preparo da suspensão de macrófagos peritoneais em meio RPMI com 10% SFB para um total de 400.000 macrófagos por ml de meio. **B.** Distribuição de 500 $\mu$ l de suspensão/poço em lâminas de cultura Lab Tek. **C.** Incubação das lâminas a 37°C em 5% CO<sub>2</sub> por 2 horas, para a formação de monocamada de macrófagos aderentes.

#### **4.3. Ensaio de internalização de cepas variáveis quanto à produção de GbpB.**

A análise da eficiência de internalização por macrófagos foi determinada para as 10 cepas distintas de *S. mutans*, segundo o método descrito por Nakano *et al.* (2004), com algumas modificações. Para isto, após 2h de incubação dos 2 x 10<sup>5</sup> macrófagos por poço em lâminas Lab Tek (como descrito anteriormente) em meio RPMI, o meio de cultura foi removido e adicionou-se aos macrófagos aderidos, a suspensão bacteriana em meio de cultura RPMI sem antibiótico (para evitar a morte bacteriana) e livre de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil) para não haver a indução do processo de internalização através de componentes opsonizantes presentes no soro.

As suspensões bacterianas foram previamente preparadas a partir de culturas bacterianas em BHI, as quais foram incubadas até uma A<sub>550nm</sub> de 0,6, correspondente a aproximadamente 10<sup>9</sup>/ml de bactérias viáveis (como determinado em culturas em BHI Agar de diluições seriadas). As células

bacterianas de 3ml destas culturas foram então separadas através de centrifugação a 8.000 x g, a 4°C por 2 min, lavadas uma vez com PBS pH7,4, e a seguir re-suspendidas em 300µl de RPMI livre de soro/antibiótico. Volumes de 12,5µl destas suspensões, contendo o equivalente a 10<sup>8</sup> células por ml, foram adicionados a 487,5µl de RPMI livre de soro/antibiótico em cada poço contendo os macrófagos. Dessa forma, foi padronizada a exposição de aproximadamente 200 bactérias por macrófago em 500µl de volume por poço.

A incubação dos macrófagos com as suspensões bacterianas foi realizado durante períodos de 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. Decorridos estes tempos, o meio de cultura presente nos poços foi removido e as lâminas Lab Tek coradas com Giemsa (Sigma), segundo as instruções do fabricante. As lâminas coradas foram então analisadas em microscópio óptico Carl Zeiss (Axiostar plus) no aumento de 100x por um único examinador (TN), previamente treinado. A eficiência de internalização de *S. mutans* foi expressa através do número total de macrófagos com bactérias internalizadas, dentre um total de 500 macrófagos analisados por poço (adaptado de Nakano *et al.*, 2004). Macrófagos incubados apenas com meio RPMI foram utilizados como controle negativo.

Um total de três experimentos independentes de internalização (com lotes distintos de macrófagos peritoneais) foi realizado em duplicata para cada uma das 11 cepas testadas. Os dados foram então expressos através das médias dos três experimentos independentes, com os respectivos desvios padrão.

#### **4.4. Ensaio de internalização dos mutantes knock-out *cov* e *vic* e respectivas cepas selvagens.**

A análise da eficiência de internalização por macrófagos foi determinada para as cepas selvagens *S. mutans* LT11 e UA159 e respectivos mutantes (*vicH*- e *covR*-), de forma semelhante à descrita no item 4.3, com a diferença de que as culturas dos mutantes foram realizadas em meio acrescido de eritromicina (5 µg/ml.) até a A<sub>550nm</sub> de 0,6. Após a obtenção dos *pellets* de 3ml de cultura (a 8.000 x g, a 4°C por 2 min) e 1 lavagem em PBS, as células bacterianas

foram re-suspendidas em 300µl de RPMI livre de soro/antibiótico, enquanto que as mutantes foram re-suspendidas em 300µl de RPMI livre de soro e acrescidas de eritromicina (5ug/ml). O restante foi realizado como descrito no item 4.3, sendo a eficiência de internalização de *S. mutans* expressa através do número total de macrófagos com bactérias internalizadas, dentre um total de 500 macrófagos analisados por poço.

Um total de três experimentos independentes, em duplicata, foi realizado para as cepas mutantes e respectivas cepas selvagens.

#### **4.5. Ensaio com os inibidores dos processos de internalização Citocalasina D, Amilorida e Monodansicadaverina.**

Para investigar os processos de internalização bacteriana, ensaios de internalização da cepa UA159 foram realizados com macrófagos previamente tratados com inibidores dos diferentes mecanismos de internalização. Para isto, utilizaram-se como inibidores a Citocalasina D (Sigma) (CD), Amilorida (Sigma) (AM) e Monodansicadaverina (MV) (Sigma).

O inibidor CD, capaz de inibir os processos de fagocitose, macropinocitose e endocitose mediada por clatrina, foi dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO) (Synth), em solução de estoque a 5mM, sendo esta armazenada a -20°C em alíquotas. Para os ensaios de inibição, a solução estoque foi diluída em RPMI 10% SFB para a concentração final de 10µM de CD (von Delwig *et al.*, 2002). Como controle negativo, macrófagos tratados apenas com a solução do solvente DMSO, foram utilizados. Os ensaios foram realizados de modo que o DMSO não atingisse concentração maior do que 0,5% no meio de cultura, o que poderia causar danos aos macrófagos (Grassmé, 1996).

O inibidor AM, capaz de inibir macropinocitose, também foi dissolvido em dimetil sulfóxido (DMSO), para armazenamento da solução estoque a 187mM, a -20°C. Para os ensaios de inibição, a solução estoque foi diluída em RPMI 10% SFB para as concentrações finais de 5000µM e 10000µM de AM (von Delwig *et al.*, 2002).

O último inibidor utilizado foi a MV, capaz de inibir endocitose mediada por clatrina. A dissolução foi feita em Ácido Acético Glacial (Synth) para que se obtivesse solução estoque a 75mM, sendo esta armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em alíquotas. Esta solução foi diluída em RPMI 10% SFB para as concentrações finais de 150 $\mu\text{M}$  de MV (Grassmé *et al.*, 1996).

Resumidamente, após a incubação dos  $2 \times 10^5$  macrófagos por poço em lâminas Lab Tek por 2h (como descrito anteriormente), o meio RPMI presente nos poços foi removido e, fez-se o pré-tratamento destas células com cada um dos inibidores nas concentrações descritas acima, durante 1h para CD e AM e por 3h para MV, a  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$ .

Após este período, o meio RPMI com inibidor foi removido e adicionou-se aos macrófagos aderidos, novo meio RPMI contendo inibidor na mesma concentração acrescido da suspensão bacteriana. Desta forma, foi mantida a exposição de aproximadamente 10, 100 e 200 bactérias por macrófago em 500 $\mu\text{l}$  da cultura/poço. A incubação dos macrófagos com as suspensões bacterianas foi realizada durante o período de 5 minutos, como definido em ensaios preliminares. Decorrido este tempo, o meio de cultura presente nos poços foi removido e as lâminas Lab Tek foram então coradas com Giemsa (Sigma) e analisadas em microscópio óptico Carl Zeiss (Axiostar plus), como previamente descrito. A eficiência de internalização de *S. mutans* foi expressa através do número total de macrófagos com bactérias internalizadas, dentre o total de 500 macrófagos analisados. Macrófagos incubados apenas com meio RPMI e DMSO a 0,5% (solvente da Citocalasina) foram utilizados como controle negativo.

Um total de três experimentos independentes de internalização com os inibidores foi realizado em duplicata para cada cepa testada. Os dados foram então expressos através das médias dos três experimentos independentes, com os respectivos desvios padrão.

#### 4.6. Análises de bactérias internalizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Os padrões de internalização bacteriana foram analisados em mais detalhes, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Segundo os critérios descritos por von Delwig *et al.* (2002), a internalização de estreptococos por fagocitose é caracterizada pela presença de membranas vesiculares intimamente associadas à superfície da bactéria internalizada, enquanto que vesículas de macropinocitose apresentam um compartimento amplo, havendo espaço entre a bactéria e a membrana endocítica.

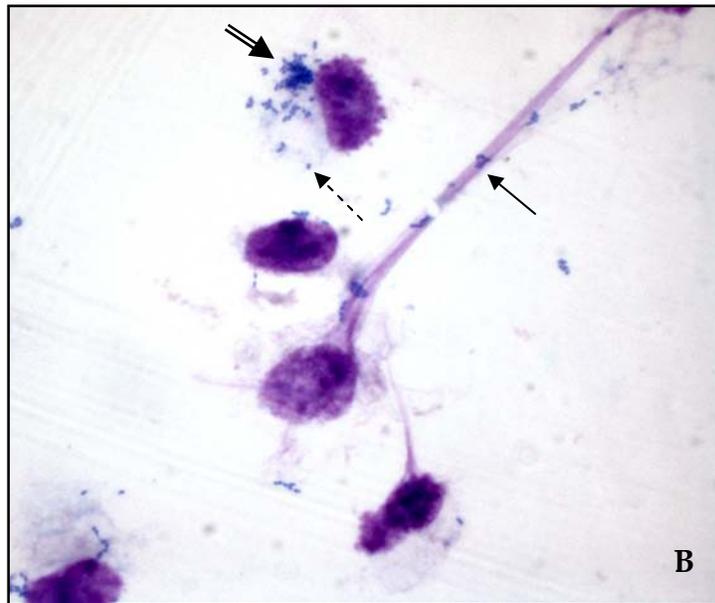
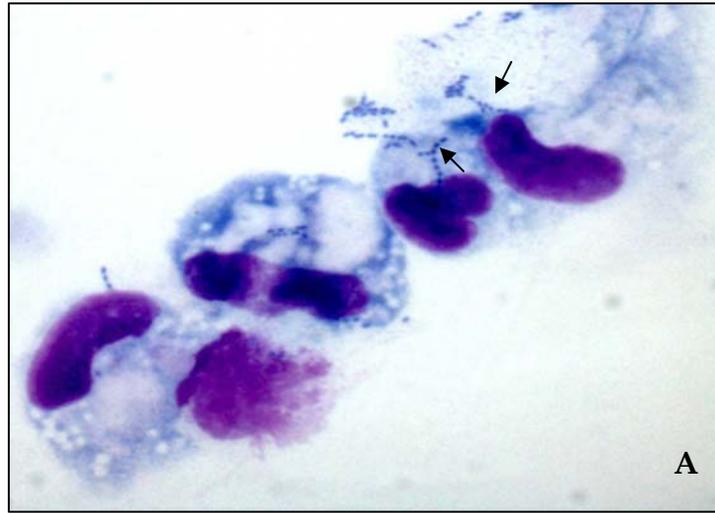
Para estas análises, após a adição de suspensão bacteriana às monocamadas de macrófagos em garrafas de cultura celular T75cm<sup>2</sup> (Nunc, Dinamarca), durante de 5 minutos nas mesmas condições descritas no item 4.3, removeu-se o meio RPMI, e os macrófagos foram lavados 3 vezes com 5ml de PBS (pH7,4). Na última lavagem, os macrófagos aderidos foram removidos por raspagem com auxílio de espalhador (scraper) (1,8cm/18cm, Corning Life Sciences, EUA) sob 10ml de PBS e a suspensão transferida para um tubo de Falcon de 15ml. Após centrifugação a 1950xg por 5min, o sobrenadante foi descartado, as células re-suspendidas em 1ml de PBS e transferidas para microtubos de 1,5ml. Para os ensaios com os inibidores, os mesmos procedimentos do item 4.5 foram seguidos e os procedimentos de lavagem e raspagem como descritos acima. Após nova centrifugação à 1950xg por 2min, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi fixado em 1ml de glutaraldeído a 2,5% diluído em tampão fosfato 0,1M pH7,3, por 6 horas a 4°C. Posteriormente à fixação, foi realizada pós – fixação por 1h em tetróxido de ósmio 1% 0,1M, em tampão fosfato pH7,3 0,1M em temperatura ambiente. Em seguida, foi feita desidratação em soluções crescentes de acetona (50%, 70%, 80%, 90% e acetona pura). Os fragmentos foram embebidos e incluídos em resina Araldite (Luft, 1961). Cortes semi-finos (1-2µm) foram obtidos utilizando um ultramicrotomo MT2B Sorvall Porter Blum com navalhas de vidro e, logo após, corados com azul de toluidina para fazer a seleção da área a ser estudada. Após a seleção, cortes

ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo MTC2 com 70-90nm. Os cortes foram coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As grades foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, EM-10, Alemanha) da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Aspecto da internalização de *S. mutans* por macrófagos peritoneais em microscopia óptica (MO).**

Os ensaios de internalização das cepas de *S. mutans* por macrófagos murinos corados com Giemsa foram observados ao microscópio óptico (aumento de 100x). Foi verificada internalização de *S. mutans* em cocos isolados, mas principalmente em cadeias, as quais foram claramente localizadas no interior do citoplasma dos macrófagos, inclusive em prolongamentos citoplasmáticos (Figura 5).



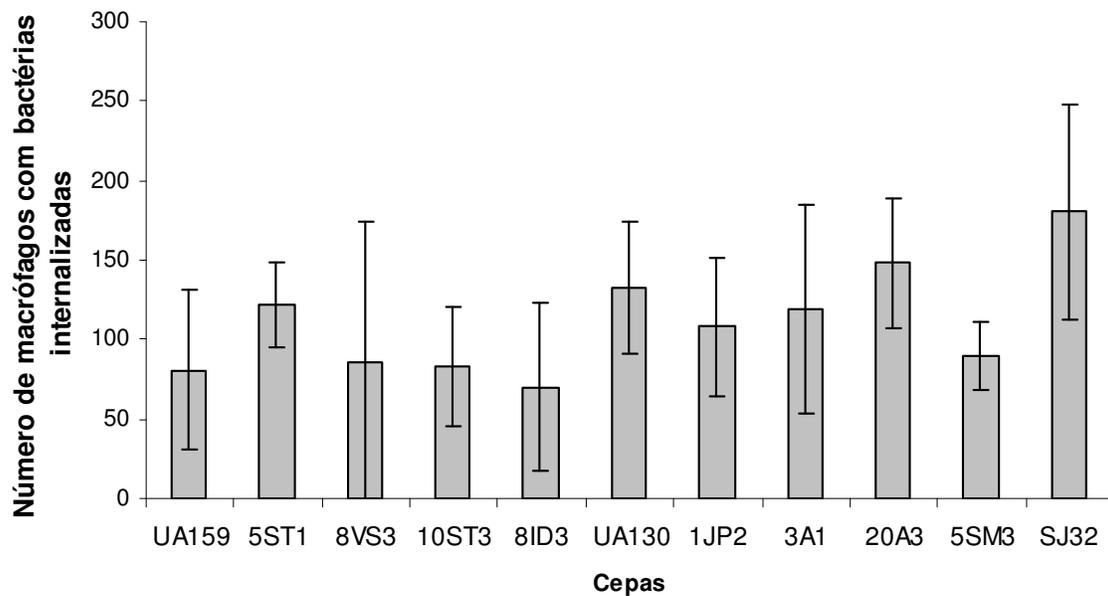
**Figura 5. A.** Cadeias de *S. mutans* localizadas no interior dos macrófagos (setas contínuas). **B.** A seta tracejada indica internalização de coco isolado. Observar aglomerado de bactérias internalizadas (seta dupla) e emissão de pseudópodes por macrófagos para o processo de internalização (seta contínua).

## **5.2. Eficiência de internalização das cepas de *S. mutans* variantes quanto à produção de GbpB por macrófagos murinos.**

A Figura 6 ilustra a eficiência de internalização de 11 cepas distintas (UA159, 5ST1, 8VS3, 10ST3, 8ID3, UA130, 1JP2, 3A1, 20A3, 5SM3 e SJ32) de *S. mutans* por macrófagos murinos peritoneais, após período de 5 minutos de contato bactéria-macrófago. A cepa SJ32 foi a mais internalizada quando comparada às demais cepas.

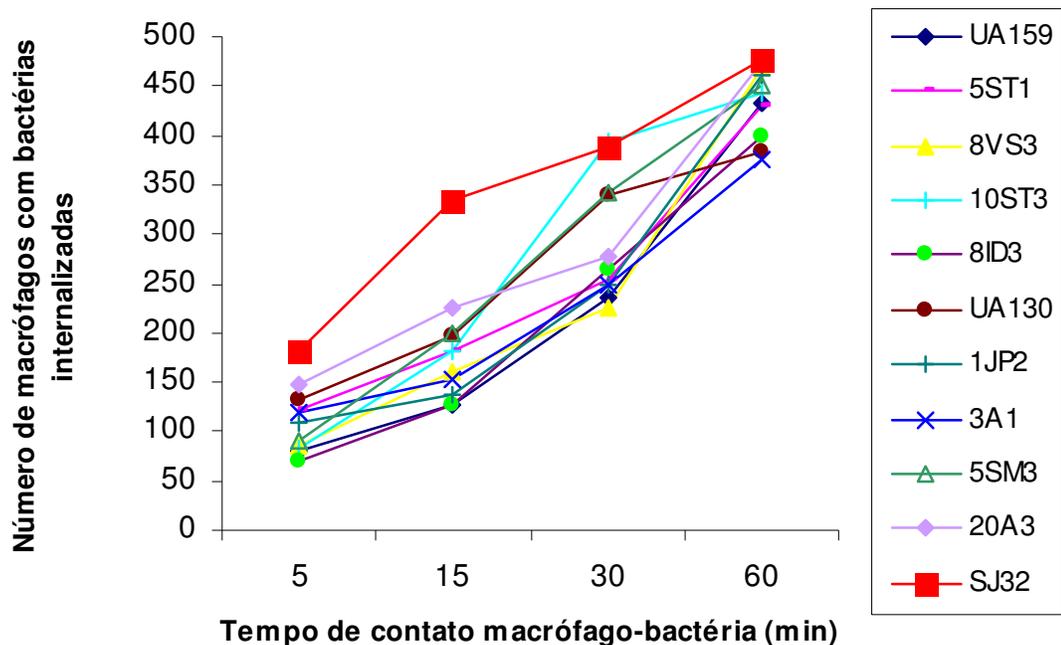
Na análise de internalização das 11 cepas de *S. mutans* determinados para quatro tempos (5, 15, 30 e 60min) de exposição aos macrófagos, detectaram-se diferenças significativas no número de macrófagos com bactérias internalizadas nos tempos 5, 15 e 60 min (Kruskall Wallis,  $P < 0,05$ ) entre as cepas testadas. Entretanto, no tempo de 15 min, estas diferenças foram detectadas apenas quando a cepa SJ32 foi comparada isoladamente com as outras cepas (Mann-Whitney U-test,  $p < 0,01$ ) (Figura 7). Através da sobreposição das curvas de internalização de todas as cepas testadas, verificou-se que a cepa (SJ32) foi internalizada de forma significativamente mais rápida, quando comparada às outras cepas analisadas.

No tempo de 120min, observou-se 100% de internalização, isto é, todos os macrófagos de um total de 500, apresentaram bactérias internalizadas.



\* Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$

**Figura 6.** Eficiência de internalização de 11 cepas distintas (UA159, 5ST1, 8VS3, 10ST3, 8ID3, UA130, 1JP2, 3A1, 20A3, 5SM3 e SJ32) de *S. mutans* por macrófagos murinos peritoneais, após período de 5 minutos de contato. Os valores das colunas correspondem às médias de macrófagos com bactérias internalizadas (um total de 500 macrófagos analisados), obtidas a partir dos valores de três experimentos independentes. As barras sobre as colunas indicam os desvios padrão.

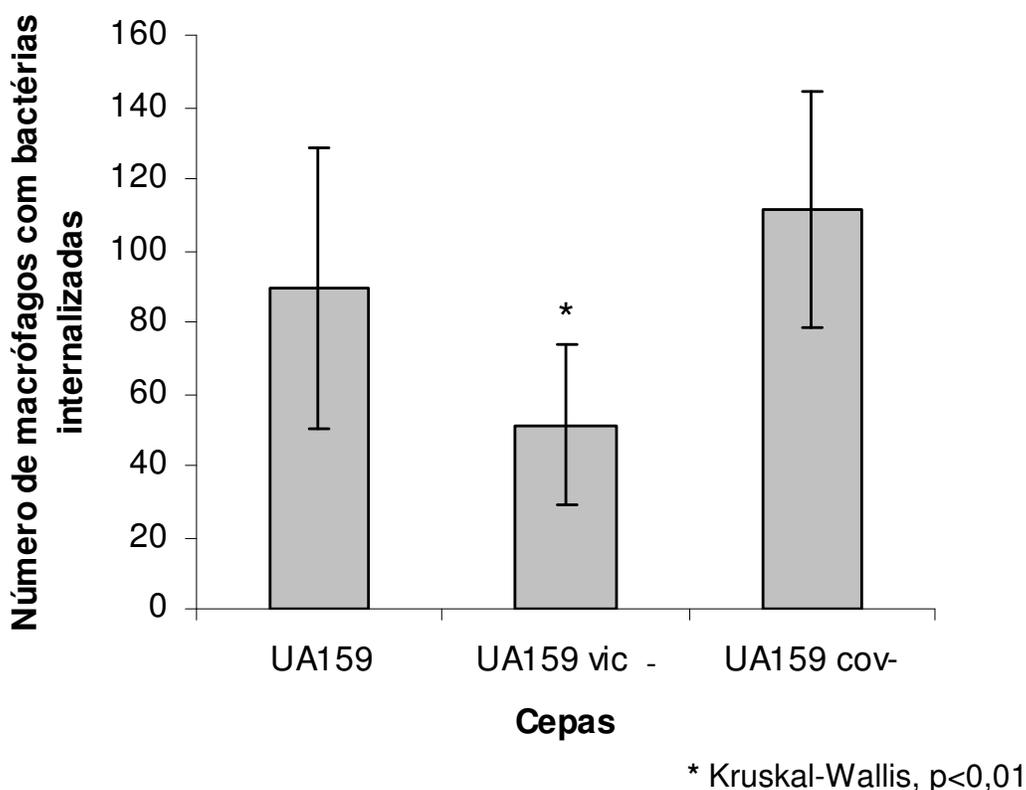


**Figura 7.** Comparação das curvas de internalização de 11 cepas de *S. mutans* por macrófagos murinos. Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes. Verifica-se que a cepa SJ32, em relação às outras cepas, foi a mais internalizada por macrófagos nos tempos de 5, 15 e 60min (Mann-Whitney U test ,  $p < 0,01$ ).

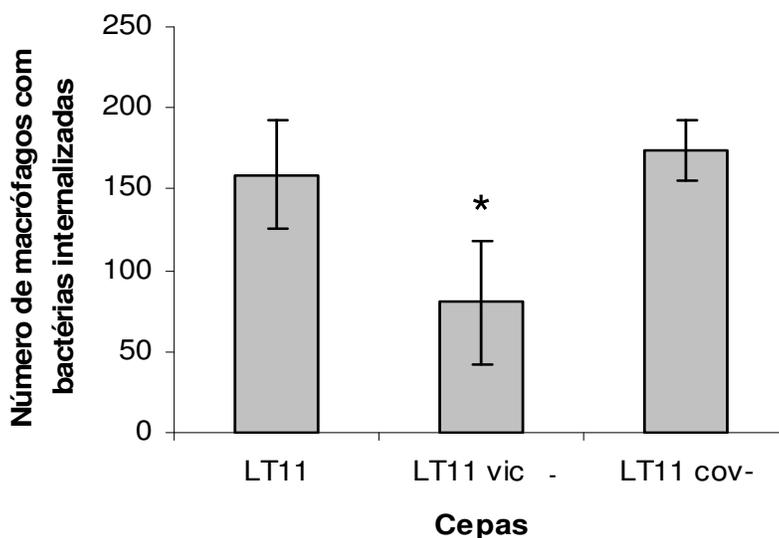
### 5.3. Efeito da inativação de *cov* e *vic* na internalização de *S. mutans* por macrófagos murinos.

Os índices de internalização das 6 cepas de *S. mutans* (duas selvagens com os respectivos mutantes *covR*- e *vicH*-) foram determinados para o tempo de 5 min de exposição aos macrófagos, em três experimentos independentes. Foi observado que a cepa UA159 mutante *vicH*- foi menos internalizada, quando comparada com a cepa selvagem (Kruskall-Walis,  $p < 0,01$ ) (Figura 8). Uma relação semelhante foi observada entre a cepa LT11 e seus respectivos knock-

outs, ou seja, LT11 *vicH*- foi menos internalizada quando comparada à cepa selvagem (Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$ ) (Figura 9). Não se observou diferença significativa entre os mutantes *covR*- obtidos a partir de LT11 e UA159 e as respectivas cepas selvagens.



**Figura 8.** Comparação da eficiência de internalização das cepas *S. mutans* selvagem UA159, mutante *vicH*- e mutante *covR*-, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. As colunas representam as médias de macrófagos com bactérias internalizadas (de um total de 500 macrófagos analisados), obtidas de três experimentos independentes; colchetes indicam os desvios padrão.



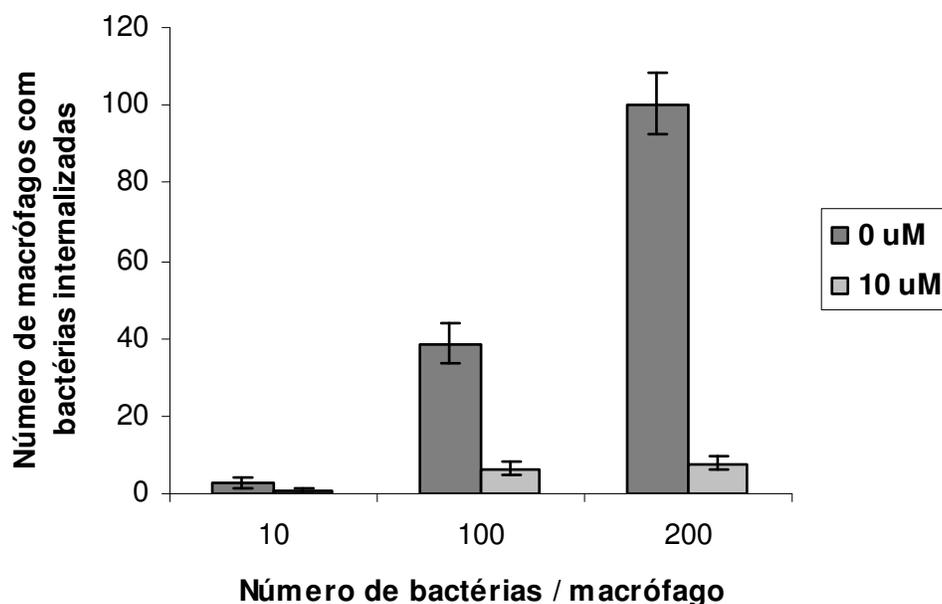
\* Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$

**Figura 9.** Comparação da eficiência de internalização das cepas *S. mutans* selvagem LT11, mutante *vicH*- e mutante *covR*-, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. As colunas representam as médias de macrófagos com bactérias internalizadas (de um total de 500 macrófagos analisados) obtidas de três experimentos independentes; colchetes indicam os desvios padrão.

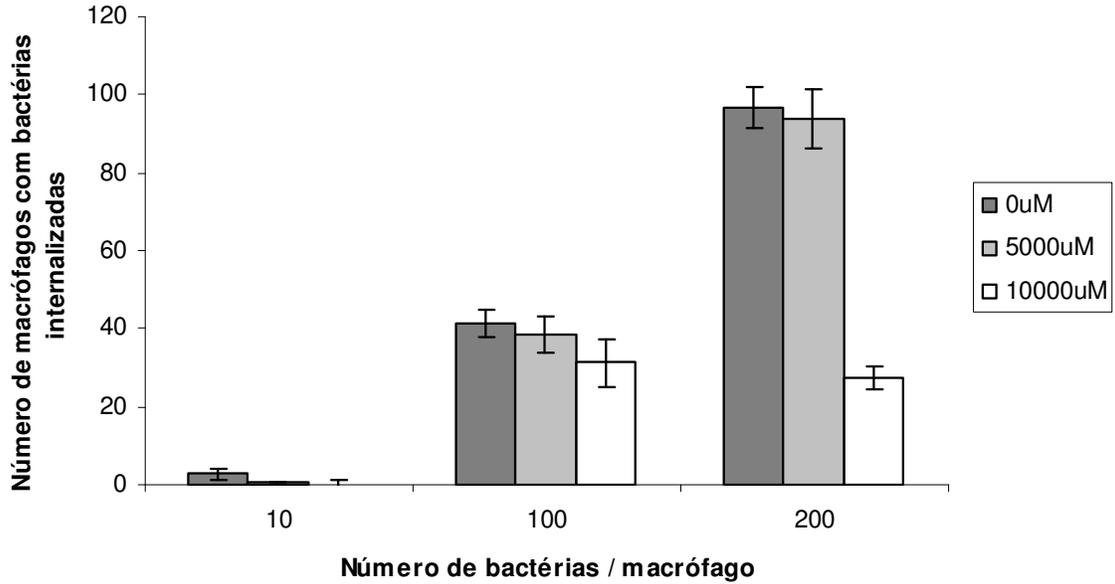
#### 5.4. Determinação dos mecanismos de internalização bacteriana por macrófagos em ensaios com inibidores.

Em ensaios com diferentes números de bactérias (10, 100 e 200) por macrófago, verificamos que todos os inibidores testados foram capazes de interferir no processo de internalização bacteriana (Figuras 10, 11 e 12). Entretanto, as inibições foram mais significativamente observadas, quando se utilizou um total de 200 bactérias por macrófago. A maior porcentagem de inibição foi obtida com a CD, a qual promoveu 98,4% de inibição da internalização bacteriana (a 200 bactérias por macrófago) (Figura 10). A amilorida também

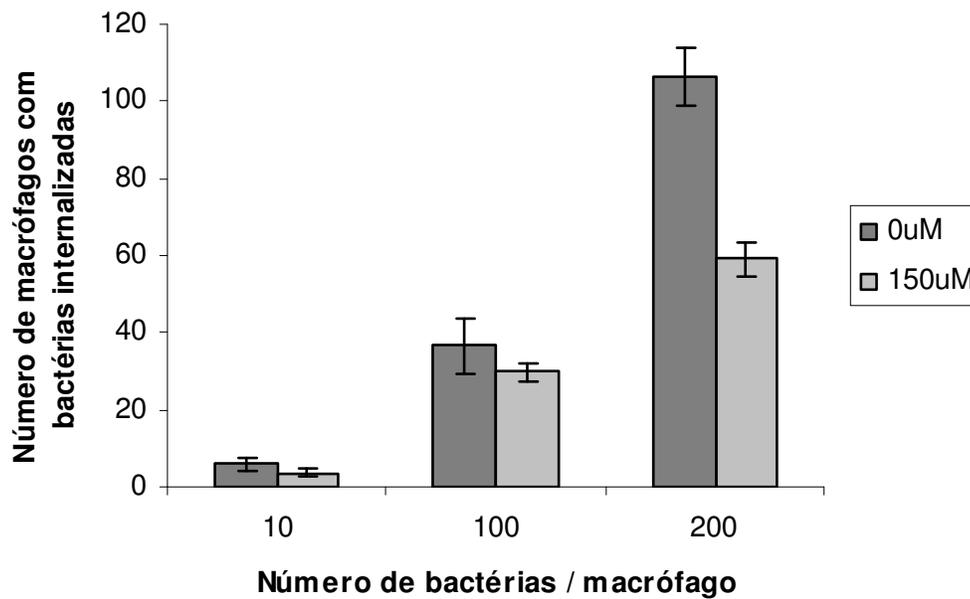
promoveu significativa inibição da internalização bacteriana (Figura 11), inibindo 94,6% da internalização (Figura 11). A MO foi a substância com menor efeito inibitório (Figura 12), embora também tenha promovido significativa redução (88,2%) do número de macrófagos com bactérias internalizadas.



**Figura 10.** Comparação da eficiência de internalização da cepa de *S. mutans* UA159, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c quando tratados com Citocalasina D a 10 $\mu$ M. As colunas representam as médias de macrófagos com bactérias internalizadas (de um total de 500 macrófagos analisados), durante o período de 5min, obtidas de três experimentos independentes; colchetes indicam os desvios padrão.

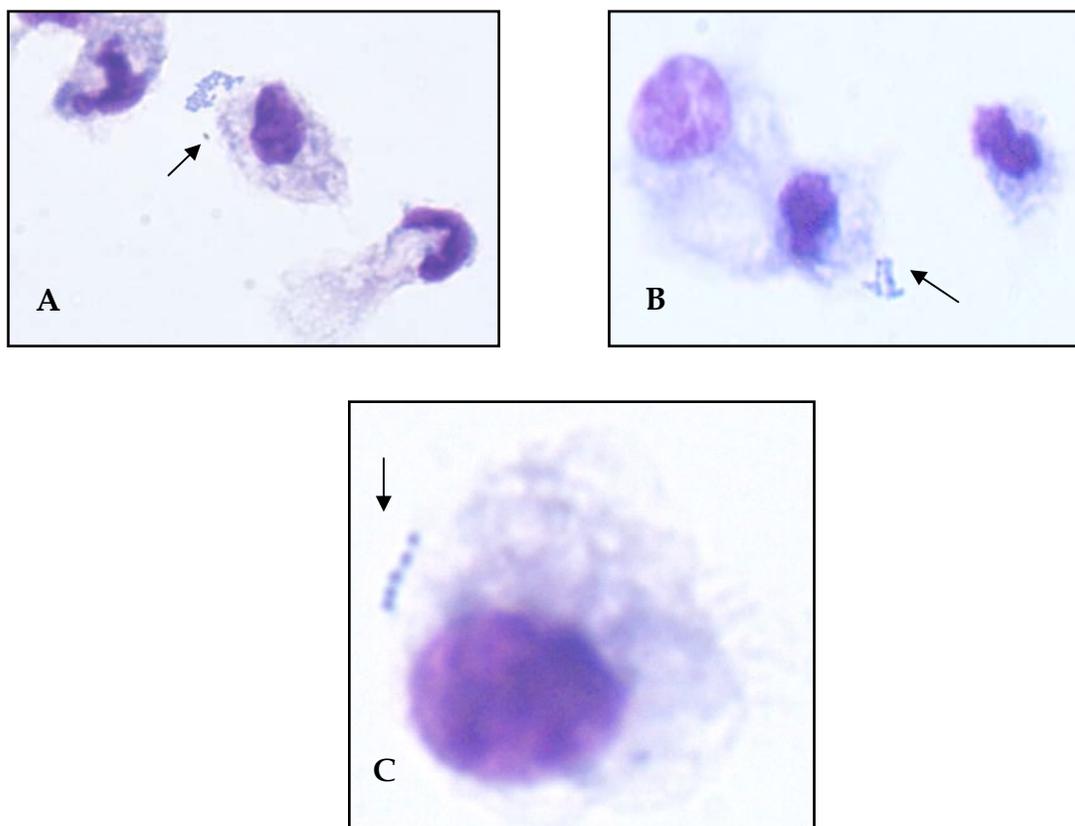


**Figura 11.** Comparação da eficiência de internalização da cepa de *S. mutans* UA159, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c tratados com Amilorida em diferentes concentrações ( $\mu\text{M}$ ). As colunas representam as médias de macrófagos com bactérias internalizadas (de um total de 500 macrófagos analisados), durante o período de 5min, obtidas de três experimentos independentes; colchetes indicam os desvios padrão.



**Figura 12.** Comparação da eficiência de internalização da cepa de *S. mutans* UA159, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c tratados com Monodansicadaverina a 150 $\mu$ M. As colunas representam as médias de macrófagos com bactérias internalizadas (de um total de 500 macrófagos analisados), durante o período de 5min, obtidas de três experimentos independentes; colchetes indicam os desvios padrão.

A análise por microscopia de luz revelou a não internalização de *S. mutans*, pelos macrófagos tratados com inibidores, pois cocos isolados, em grumos ou em cadeias (Figura 13) foram claramente localizados externamente ao citoplasma dos macrófagos.

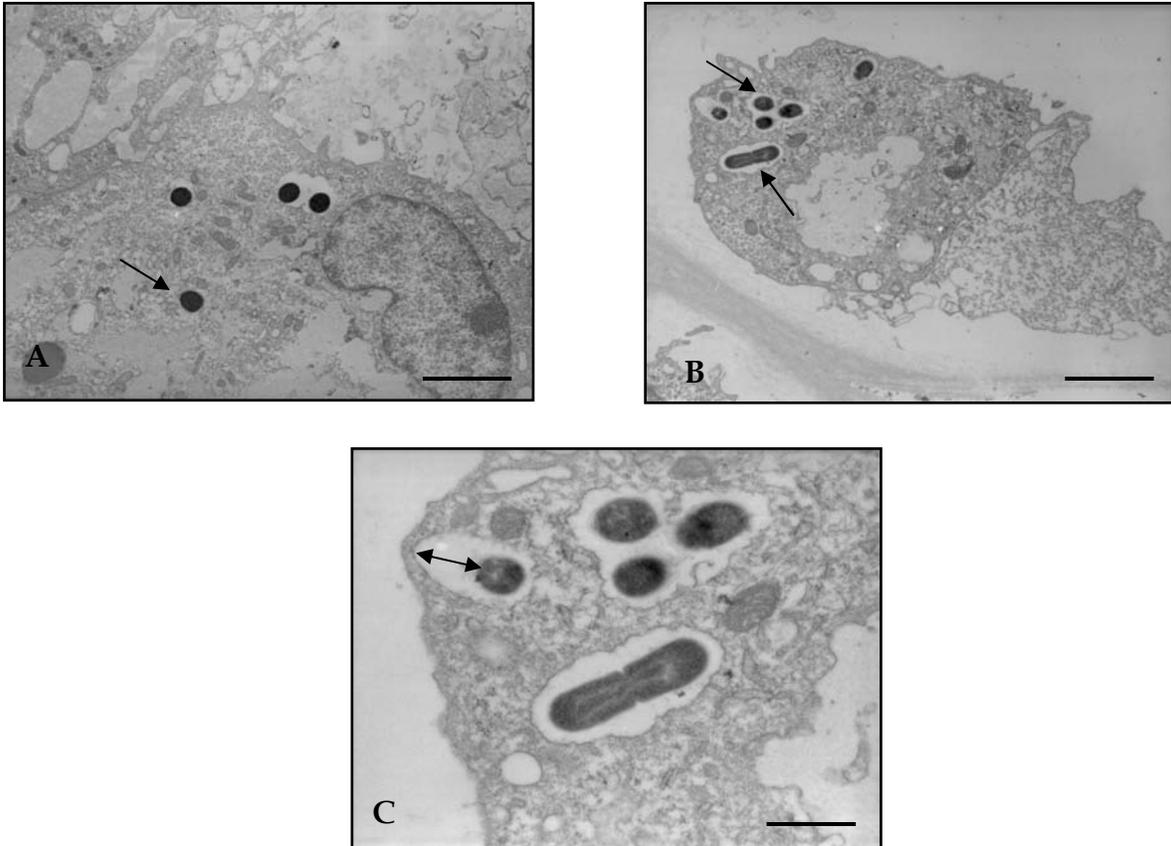


**Figura 13.** Aspecto da não internalização *S. mutans* por macrófagos murinos (Giemsa, 100x) tratados com o inibidor CD a 10 $\mu$ M. **A.** Observar a presença de coco isolado (seta) adjacente ao citoplasma dos macrófagos. **B.** Aglomerado de bactérias localizado externamente ao citoplasma macrofágico (seta). **C.** Macrófago com cadeia de estreptococos não internalizada (seta).

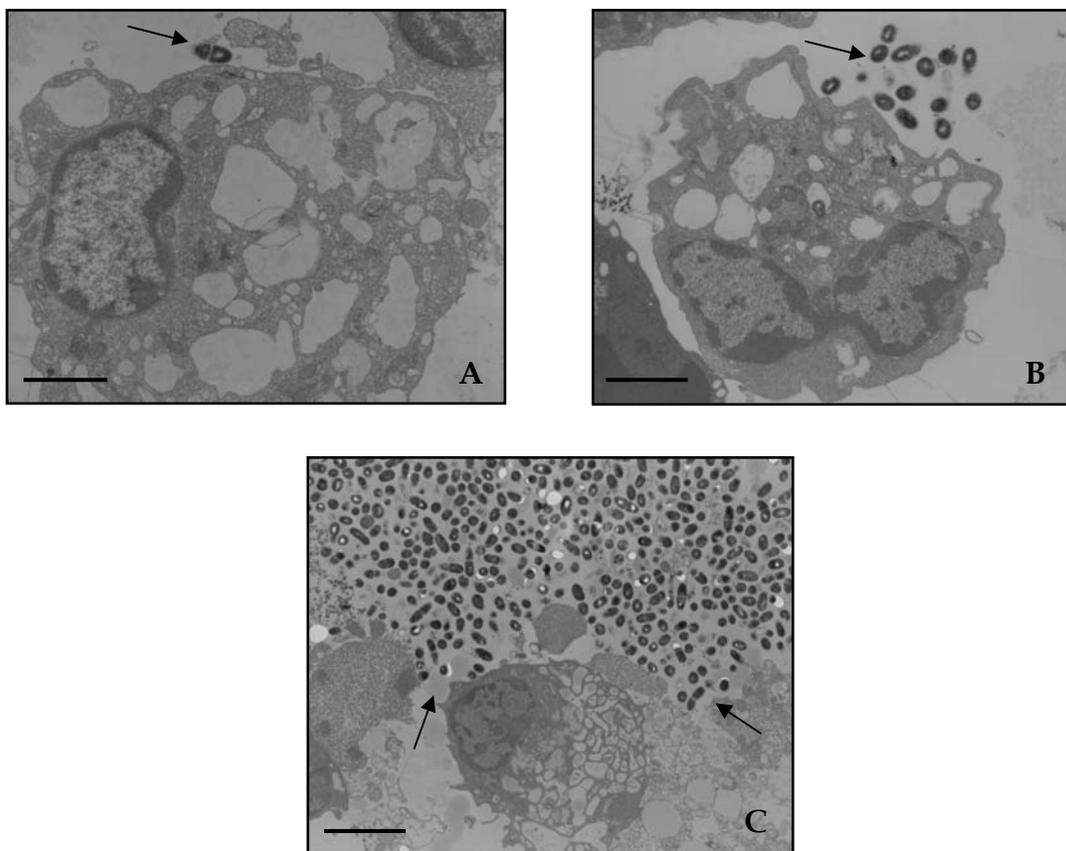
### **5.5. Análises de bactérias internalizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).**

A Figura 14 ilustra os aspectos morfológicos dos compartimentos citoplasmáticos contendo bactérias internalizadas por macrófagos murinos. A presença de espaços relativamente amplos entre a superfície bacteriana e a membrana vesicular dos macrófagos sugere a internalização por macropinocitose. Por outro lado, vesículas menores sugeriram internalização por fagocitose ou endocitose. A justaposição da membrana vesicular à superfície bacteriana, observada em alguns cortes, indicam a ocorrência de fagocitose.

Nos macrófagos tratados com inibidores de cada processo de internalização (CD, AM e MV), não se verificou a presença de bactérias no interior citoplasmático, corroborando os ensaios quantitativos determinados por microscopia óptica. A Figura 15 ilustra aspecto representativo de macrófagos previamente tratados com CD expostos às bactérias. As bactérias observadas encontravam-se sempre no espaço extracelular, assim como foi observado para macrófagos tratados com os outros inibidores.



**Figura 14.** Aspectos representativos das bactérias no interior de macrófagos peritoneais. **A.** Bactéria internalizada, possivelmente, por fagocitose ou endocitose mediada por clatrina, pois não há espaço entre a membrana e a bactéria englobada. **B.** Grande número de bactérias internalizadas (setas). **C.** Maior aumento da Figura B indicando espaço entre a membrana e bactéria internalizada sugerindo internalização por macropinocitose (seta). Indicação das barras: A = 0,54 $\mu$ m, B = 0,86 $\mu$ m, C = 0,30  $\mu$ m.



**Figura 15.** Aspectos representativos dos macrófagos expostos a bactérias após tratamento com os inibidores CD (A), AM (B) ou MV (C). As setas indicam bactérias localizadas externamente à célula macrofágica. Indicação das barras: A= 0,86 $\mu$ m, B= 0,58 $\mu$ m, C = 0,86 $\mu$ m.

## 6. DISCUSSÃO

Há diversas evidências de que diferentes componentes das bactérias podem interferir no reconhecimento pelo sistema imunológico, e conseqüentemente na virulência bacteriana e nos seus padrões de imunogenicidade.

*Streptococcus gordonii*, espécie comumente encontrada em casos de endocardite, possui adesinas de superfície, as quais foram associadas à capacidade destes microrganismos de sobreviver no interior de PMN (Lee *et al.*,

2006). *Streptococcus suis*, agente causador de meningite suína, possui cápsula polissacarídica que confere propriedades anti-fagocíticas a macrófagos (Charland *et al.*, 1998). Da mesma forma, *S. suis* tipo 2, possui cápsula rica em ácido siálico o que confere a este microrganismo uma propriedade anti-fagocítica (Charland *et al.*, 1996). A bactéria *Enterococcus faecalis*, a qual faz parte da microflora normal do trato gastro-intestinal, pode ser causadora de infecções em humanos, tendo sido associada a casos de endocardite bacteriana. Cepas desta espécie foram capazes de sobreviver em macrófagos murinos por 72 h. Produtos secretados por este microrganismo foram capazes de interferir nos mecanismos antibactericidas produzidas por macrófagos (Gentry-Weeks *et al.*, 1999).

Em *S. mutans*, estudos indicam que padrões de expressão de proteínas de superfície interferem no processo de reconhecimento por células de defesa e, conseqüentemente, na agressividade de infecção por cepas específicas (Nakano *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2006). Três classes de principais antígenos de superfície de *S. mutans* estão envolvidas na patogênese molecular da cárie dentária, entre eles, a adesina Antígeno I/II, a qual se liga especificamente a componentes adsorvidos às superfícies dentárias nas fases iniciais de formação do biofilme; as glucosiltransferases (GtfB, GtfC e GtfD), proteínas catalisadoras da síntese de glucanos extracelulares a partir da sacarose da dieta e as proteínas ligantes de glucano (Gbps, referente à “glucan-binding proteins”; GbpA, GbpB, GbpC e GbpD). As Gtfs e Gbps participam do processo de acúmulo de *S. mutans* através da produção e interação com a matriz extracelular de glucanos do biofilme dentário (Smith, 2002). Análises em modelos de cárie experimental em animais indicam que diferentes componentes da superfície bacteriana são imunogênicos e que a indução de anticorpos específicos pode proteger contra a cárie dentária (Smith, 2002, Mattos-Graner & Smith, 2004). Nakano *et al.* (2006), utilizaram mutantes knock-out do AgI/II (PAc) e verificaram que estes apresentam uma taxa de internalização por leucócitos polimorfonucleares (PMN) significativamente menor do que as da cepa selvagem, sugerindo a participação desta adesina no reconhecimento e/ou internalização por PMN. Outros componentes da parede

celular parecem interferir no processo de internalização por neutrófilos, sendo que as cepas de *S. mutans* menos susceptíveis à internalização são mais aptas a promover endocardite bacteriana (Nakano *et al.*, 2004). Tsuda *et al.* (2000), verificaram que alguns sorotipos específicos de *S. mutans* relacionados à parede celular rica em polissacarídeo foram resistentes à fagocitose por PMN.

Em estudo longitudinal de crianças durante a fase de erupção dentária foi verificado que crianças que desenvolviam intensa resposta de anticorpos IgA salivar a GbpB eram menos susceptíveis à infecção por *S. mutans* quando comparadas à crianças que não apresentam ou apresentavam baixos níveis deste anticorpos na saliva (Nogueira *et al.*, 2005; Nogueira *et al.*, 2007), entretanto não se sabe qual o papel desta proteína no reconhecimento bacteriano por células de defesa. Não verificamos associação entre a produção e localização de GbpB e a frequência de internalização por macrófagos murinos (Figura 6). As cepas testadas apresentavam padrões distintos de produção e localização de GbpB na superfície celular (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). As cepas UA130, 5SM3, 8ID3, 8VS3 e 3A1 apresentam a maior parte da GbpB na forma associada à superfície celular, enquanto que nos outros isolados testados (SJ32, 20A3, 10ST3, 1JP2 e 5ST1), a maior parte da GbpB é produzida livre no sobrenadante de cultura (forma secretada) (Mattos-Graner *et al.*, 2001b). Apesar de terem sido encontradas diferenças significativas na eficiência de internalização entre as cepas testadas, estas diferenças não estiveram associadas às diferenças na produção e localização de GbpB. Estes resultados sugerem que os diferentes padrões de produção e localização de GbpB não interferem no processo de internalização por macrófagos. A comparação de diversas cepas de *S. mutans* demonstrou que a maioria dos genótipos apresentam um padrão semelhante de internalização (Figuras 6 e 7). Verificou-se, ainda, que a cepa SJ32 foi a mais internalizada pelos macrófagos murinos quando comparada às outras cepas (Figuras 6 e 7), esta diferença foi estatisticamente significativa nos tempos de 5, 15 e 60min (Figura 7). As razões para esta diferença precisam ser elucidadas. Outros antígenos da parede celular podem estar relacionados a estas diferenças (Nakano *et al.*, 2006)

e comparações do perfil eletroforético de extratos de parede celular poderiam auxiliar nesta investigação.

Análise de diversos patógenos das mucosas revelam que o contato bacteriano com células epiteliais e células do sistema imune inato ativam diversos sistemas de transcrição bacteriano e a expressão de genes de virulência (Voyich *et al.*, 2004; Hosogi & Duncan, 2005), muitos destes, codificando proteínas de superfície ou secretadas (Jadoun & Sela, 2000; Kreikemeyer *et al.*, 2003). O padrão de expressão de antígenos de superfície reconhecidos por fagócitos é controlado por SDC em espécies relacionadas a *S. mutans* como *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae* (Voyich *et al.*, 2004; Lei *et al.*, 2001). Entre estes sistemas, o sistema Vic (de *virulence of control*) e o sistema repressor Cov (de *control of virulence*) foram também identificados em *S. mutans* e parecem regular a expressão de *gtfB*, *gtfC* e *gbpB* (Senadheera *et al.*, 2005, Biswas & Biswas, 2006).

Foram realizados ensaios para a determinação da eficiência de internalização, por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, de duas cepas distintas (UA159 e LT11) e dos quatro mutantes (*vicH*<sup>-</sup> e *covR*<sup>-</sup>) construídos em nossos laboratórios. O objetivo da construção destes mutantes foi caracterizar a influência da inativação dos genes *covR* e *vicH* na produção de GbpB em cepas de *S. mutans* que variam quanto à produção desta proteína. Os dados indicam que o gene *gbpB* é regulado por ambos os SDC, repressor (Cov) e indutor (Vic) de genes de virulência (Stipp *et al.*, 2007).

No tempo de 5 min de exposição de macrófagos a bactérias, observou-se que as cepas mutantes LT11 *vicH*<sup>-</sup> e UA159 *vicH*<sup>-</sup> foram significativamente menos internalizadas quando comparadas com suas respectivas cepas selvagens (Kruskall-Wallis,  $p < 0,01$ ) (Figura 8 e 9). Análises semelhantes foram realizadas com mutantes *vicR*<sup>-</sup> em *S. pyogenes*, mas não foram detectadas diferenças significativas na internalização por neutrófilos entre os mutantes e a cepa selvagem (Liu *et al.*, 2006). As razões para as diferenças entre o nosso estudo e o estudo de Liu *et al.* (2006), precisam ser elucidadas e podem estar associadas às

diferenças entre as linhagens fagocíticas utilizadas (macrófagos *versus* neutrófilos) e a variações entre os grupos de genes regulados por este sistema entre as espécies *S. mutans* e *S. pyogenes*.

Quanto ao sistema *cov*, verificamos uma tendência a uma menor taxa de internalização dos mutantes *covR*- em comparação com as cepas selvagens (Figuras 8 e 9), mas esta redução não foi significativa. Contrariamente, em *S. pyogenes*, o mutante *knockout* de *covR* foi menos internalizado por células epiteliais (Jadoun & Sela, 2000), demonstrando provável diferença entre as espécies e entre as linhagens celulares testadas. Em *S. mutans*, o sistema *cov* parece incompleto uma vez que o ortólogo do receptor *covS* não foi detectado nesta espécie, sendo possível que o regulador de resposta *covR* seja ativado por receptores de outros sistemas SDC (Biswas e Biswas, 2005). Maiores estudos deverão ser realizados para verificar a influência dos sistemas Vic e Cov na resposta imune a *S. mutans* em modelos experimentais de cárie. Estes deverão contribuir para a seleção de alvos terapêuticos no controle da cárie dentária.

Para que se consiga entender os processos de reconhecimento e internalização de microrganismos por células do sistema imune, é fundamental que se tenha conhecimento da estrutura citoesquelética. O citoesqueleto apresenta papel fundamental no espalhamento do citoplasma, sendo constituído de vários tipos de filamentos de proteínas visíveis ao microscópio eletrônico, formando uma rede tridimensional interligada em todo citoplasma. Cada um dos componentes do citoesqueleto é composto por subunidades protéicas simples que se polimerizam para formar filamentos uniformes. Estes sofrem constantes desmontagens em suas subunidades monoméricas e remontagens em filamentos, permitindo o transporte de organelas para o interior da célula. A proteína actina, presente no citoesqueleto, participa deste processo de internalização, pois sua polimerização permite que esta estrutura modifique sua forma e movimente-se gerando invaginações de membrana as quais facilitam a captação de fragmentos externos à célula, como por exemplo, microrganismos (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003).

A Citocalasina D inibe a polimerização dos filamentos de actina, ou seja, inibe a adição das subunidades monoméricas na extremidade de polimerização dos filamentos de actina (Cooper, 1987). Portanto, a CD interfere tanto na fagocitose quanto na macropinocitose e endocitose mediada por clatrina, pois todos estes processos apresentam o envolvimento de actina (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003). Além de distinguir os processos de internalização, os ensaios com os inibidores foram importantes para o controle do método de determinação da eficiência de internalização bacteriana por macrófagos, através das análises em microscopia óptica.

Utilizando-se a concentração de 10 $\mu$ M de CD e pré-tratamento de macrófagos por 1h, obtivemos inibição do processo de internalização bacteriana de aproximadamente 98,4%. von Delwig *et al.* (2002), utilizando a mesma concentração de CD, bloquearam completamente a captação de *Streptococcus pyogenes* por macrófagos da linhagem J774 (ATCC) em 10 minutos de exposição das bactérias aos macrófagos (B/M). Valentin-Weigand *et al.* (1996), utilizando a concentração de 1 $\mu$ M conseguiram 84% de inibição da captação desta mesma bactéria por macrófagos da linhagem J774 (ATCC) durante 5min de exposição (B/M). Em estudos com outros gêneros de bactérias, Rikihisa *et al.* (1994), conseguiram bloquear completamente a internalização de *Ehrlichia risticii* por macrófagos da linhagem P388D1 em quatro dias de exposição (B/M) utilizando CD a 2 $\mu$ M. Grassmé *et al.* (1996), utilizaram CD a 3 $\mu$ M e obtiveram bloqueio total da captação de *Neisseria gonorrhoeae* por células epiteliais em 1h de exposição das bactérias a estas células. As comparações entre estes estudos e o nosso é dificultada pelas diferenças entre os gêneros de bactérias testadas e as linhagens celulares variáveis.

Outro inibidor utilizado foi a AM, inibidor da macropinocitose, por interferir nos canais de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> bloqueando a entrada de fluído na célula e, conseqüentemente, impedindo a formação do macropinosomo. Observamos inibição de 94,6% da internalização bacteriana ao utilizarmos 10.000 $\mu$ M de AM e realizarmos pré-tratamento dos macrófagos por 1h. Com a utilização de AM a

3.000 $\mu$ M, von Delwig *et al.*, 2002 observaram bloqueio total da captação de *Streptococcus pyogenes* por macrófagos da linhagem J774 (ATCC) em 10min de exposição (B/M), realizando um pré-tratamento das células por meia hora.

O processo de internalização por endocitose mediada por clatrina pode ser inibido por MV, pois esta substância bloqueia a transglutaminase necessária para a formação da cápsula de clatrina, característica principal da endocitose (Goldstein *et al.*, 1979). Utilizando MV a 150 $\mu$ M e tendo realizado pré-tratamento dos macrófagos por 3h, observamos um bloqueio de 88,2% na captação de *S. mutans* por macrófagos. Rikihisa *et al.* (1994), puderam bloquear completamente a internalização de *Ehrlichia risticii* por macrófagos da linhagem P388D1 em quatro dias de exposição (B/M) utilizando MV a 100 $\mu$ M e um tempo de pré-tratamento dos macrófagos igual a realizada em nossos experimentos (3h). Valentin-Weigand *et al.* (1996), em seu estudo com *Streptococcus pyogenes*, tratando macrófagos da linhagem J774 (ATCC) com 10 $\mu$ M de MV durante 5min de exposição (B/M), foram capazes de inibir a internalização bacteriana em 54%. Grassmé *et al.* (1996), utilizando a mesma concentração utilizada em nosso estudo, não obtiveram efeito na infecção de células epiteliais por *Neisseria gonorrhoeae* em 1h de exposição bactéria/célula. von Delwig *et al.* (2002), não encontraram inibição do processo de internalização de *Streptococcus pyogenes* utilizando uma concentração de 20 $\mu$ M de MV durante 10min de exposição (B/M). Apesar de diferenças na eficiência de inibição dos processos de internalização, os ensaios realizados com os inibidores foram importantes para validar o método quantitativo de determinação dos índices de internalização bacteriana através da contagem por microscopia óptica.

Os experimentos realizados com os inibidores indicam que *S. mutans* podem ser internalizados por processos dependentes (fagocitose) ou independentes de receptores (macropinocitose e endocitose). Análises por microscopia eletrônica de transmissão corroboram com estes dados, uma vez que diferentes aspectos morfológicos das membranas envolvendo as bactérias internalizadas foram detectados (Figura 14).

Os ensaios de MET (Figuras 14 e 15) realizados com a cepa UA159 (representativa do padrão mais comum de internalização) foram compatíveis com os ensaios utilizando-se diferentes inibidores indicando que *S. mutans* são internalizados por fagocitose, macropinocitose e endocitose mediada por clatrina, nas condições testadas. Espaço entre a membrana endocítica e as bactérias, são sugestivos de macropinocitose (von Delwig *et al.*, 2002), enquanto que, a internalização de estreptococos por fagocitose é caracterizada pela presença de membranas vesiculares intimamente associadas à superfície da bactéria internalizada (von Delwig *et al.*, 2002), como observado na Figura 14.

Assim como em *Streptococcus pyogenes* (von Delwig *et al.*, 2002; Valenting-Weigand *et al.*, 1996), *Streptococcus mutans* podem ser internalizados por diferentes processos como a fagocitose, macropinocitose e endocitose mediada por clatrina nas condições testadas. Estes dados são compatíveis com a hipótese de que padrões distintos de antígenos de *S. mutans* podem ser apresentados por CAA determinando, assim, diferenças na especificidade adaptativa a estas bactérias (Nogueira *et al.*, 2007).

## 7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

1) Variações na produção de GbpB não influenciam significativamente na susceptibilidade de *S. mutans* à internalização por macrófagos murinos, na ausência de opsoninas.

2) A inativação de *vicH* reduz significativamente a eficiência de internalização de *S. mutans* por macrófagos murinos, na ausência de opsoninas. No caso da inativação de *covR*, não houve influência significativa na eficiência de internalização deste microrganismo.

3) *S. mutans* podem ser internalizados por macrófagos murinos através de diferentes mecanismos, incluindo-se fagocitose, macropinocitose e endocitose mediada por clatrina.

## REFERÊNCIAS

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro. Revinter; 3ª ed. 2000. p. 468.
2. Adams, DO. Macrophages. *Methods Enzymol*. 1979; 58: 494-506.
3. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*. 1999; 17: 593-623.
4. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang G, Carson MB, et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 14434-9.
5. Alvarez de la Rosa D, Canessa CM, Fyfe GK, Zhang P. Structure and regulation of amiloride-sensitive sodium channels. *Annu Rev Physiol*. 2000; 62: 573-94.
6. Araki N, Johnson MM, Swanson JA. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol*. 1996; 135(5): 1249-60.
7. Azuma M. Fundamental mechanisms of host immune responses to infection. *J Periodontol Res*. 2006; 41: 361-73.
8. Baggett JJ, Wendland B. Clathrin function in yeast endocytosis. *Traffic*. 2001; 2: 297-302.
9. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14: 89-99.

10. Bermudez LE, Petrofsky M, Sangari F. Intracellular phenotype of *Mycobacterium avium* enters macrophages primarily by a macropinocytosis-like mechanism and survives in a compartment that differs from that with extracellular phenotype. *Cell Biol Int*. 2004; 28(5): 411-9.
11. Biswas S, Biswas I. Regulation of the glucosyltransferase (*gtfBC*) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2006; 188(3): 988-98.
12. Brandtzaeg P. Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. *APMIS*. 1995; 103: 1-19.
13. Brandtzaeg P. Overview of the mucosal immune system. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1989; 146: 13-25.
14. Bretscher MS & Thomson JN. Distribution of ferritin receptors and coated pits on giant HeLa cells. *EMBO J*. 1983; 2: 599-603.
15. Broeck DV, Lagrou AR, Wolf MJS. Distinct role of clathrin-mediated endocytosis in the functional uptake of cholera toxin. *Acta Biochimi Pol*. 2007; 54: 757-67.
16. Burne RA. Oral streptococci, products of their environment. *J Dent Res*. 1998; 77: 445-452.
17. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*. 1993; 72: 37-45.

18. Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun.* 2000; 68(7): 4018-23.
19. Cavaillon JM. Cytokines and macrophages. *Biomed Pharmacother.* 1994; 48: 445-53.
20. Charland N, Kobish M, Martineau-Doizé B, Jacques M, Gottschalk M. Role of capsular sialic acid in virulence and resistance to phagocytosis of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Immunol Medic Microbiol.* 1996; 14: 195-203.
21. Charland N, Harel J, Kobish M, Lacasse S, Gottschalk M. *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression. *Microbiol.* 1998; 144: 325-32.
22. Chia JS, Chang LY, Shun CT, Chang YY, Tsay YG, Chen JY. A 60-kilodalton immunodominant glycoprotein is essential for cell wall integrity and the maintenance of cell shape in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 2001; 69: 6987-98.
23. Childers NK, Tong G, Li F, Dasanayake AP, Kirk K, Michalek SM. Humans immunized with *Streptococcus mutans* antigens by mucosal routes. *J Dent Res.* 2002; 81: 48-52.
24. Clarke JK. On the bacteria factor in the etiology of dental caries. *J Exp Path.* 1924; 5: 141-7.
25. Cohn ZA. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J Immunol.* 1978; 121(3): 813-16.

- 26.** Cole MF, Bryan S, Evanas MK, Pearce CL, Sheridan MJ, Sura PA *et al.* Humoral immunity to commensal oral bacteria in human infants: salivary secretory immunoglobulin A antibodies reactive with *Streptococcus mitis* biovar 1, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis* during the first two years of life. *Infect Immun.* 1999; 67: 1878-86.
- 27.** Cook MT, Hayball PJ, Hutchinson W, Nowak B, Hayball JD. The efficacy of a commercial  $\beta$ -glucan preparation, EcoActiva, on stimulating respiratory burst activity of head-kidney macrophages from pink snapper (*Pagrus auratus*), Spararidae. *Fish Shellfish Immunol.* 2001; 11: 661-72.
- 28.** Cooper JA. Effects of cytochalasin and *Phalloidin* on actin. *J Cell Biol.* 1987; 105: 1473-78.
- 29.** Crawford RM, Finbloom DS, Chara J, Paul WE, Meltzer MS. B-cell stimulatory factor-1 (IL-4) activated macrophages for increased tumoricidal activity and expression of a antigens. *J Immunol.* 1987; 139: 135-141.
- 30.** Delima J, Dyke TEV. Origin and function of the celluler components in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000.* 2003; 31: 55-76.
- 31.** Delwig AA, Robinson JH. Two T cell epitopes from the M5 protein of viable *Streptococcus pyogenes* engage different pathways of bacterial antigen processing in mouse macrophages. *J Immunol.* 1998; 160: 5267-72.
- 32.** Dramsi S, Cossart P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998; 14: 137-66.

- 33.** Draper DW, Bethea HN, He YW. Toll-like receptor 2-dependent and -independent activation of macrophages by group B streptococci. *Immunol Lett.* 2006; 102(2): 202-14.
- 34.** Echenique JR, Trombe MC. Competence repression under oxygen limitation through the two-component MicAB signal-transducing system in *Streptococcus pneumoniae* and involvement of the PAS domain of MicB. *J Bacteriol.* 2001; 183: 4599-4608.
- 35.** Engqvist-Goldstein AEY, Drubin DG. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003; 19: 287-332.
- 36.** Fabret C, Hoch A. A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J Bacteriol.* 1998; 180: 6375-83.
- 37.** Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science.* 1996; 272(5258): 50-3.
- 38.** Francis CL, Ryan TA, Jones BD, Smith SJ, Falkow S. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature.* 1993; 364(6438): 639-42.
- 39.** Gentry-Weeks CR, Karkhoff-Schweizer R, Pikis A, Estay M, Keith JM. Survival of *Enterococcus faecalis* in mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun.* 1999; 2160-65.
- 40.** Goldstein JL, Anderson RGW, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature.* 1979; 279: 679-85.

41. Graham MR, Smoot LM, Migliaccio CA, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF *et al.* Virulence control in group A Streptococcus by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and *in vivo* infection modeling. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99(21): 13855-60.
42. Grassmé HU, Ireland RM, van Putten JP. Gonococcal opacity protein promotes bacterial entry-associated rearrangements of the epithelial cell actin cytoskeleton. Infect Immun. 1996; 64(5): 1621-30.
43. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals reactive species and toxicology. In: Halliwell B, Gutteridge, editors. Free Radicals Biol Med. New York. 1999; 544-616.
44. Hewlett LJ, Prescott AR, Watts C. The coated pit and macropinocytic pathways serve distinct endosome populations. J Cell Biol. 1994; 124: 689-703.
45. Hosogi Y, Duncan MJ. Gene expression in *Porphyromonas gingivalis* after contact with human epithelial cells. Infect Immun. 2005; 73(4): 2327-35.
46. Hosogi Y, Duncan MJ. Gene expression in *Porphyromonas gingivalis* after contact with human epithelial cells. Infect Immun. 2005; 73(4): 2327-35.
47. Jadoun J, Sela S. Mutation in *csrR* global regulator reduces *Streptococcus pyogenes* internalization. Microb Pathog. 2000; 29(5): 311-7.
48. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 197-216.

- 49.** Jiang SM, Cieslewicz MJ, Kasper DL, Wessels MR. Regulation of virulence by a two-component system in group B streptococcus. *J Bacteriol.* 2005; 187(3):1105-13.
- 50.** Jutras I, Desjardins M. Phagocytosis: At the crossroads of innate and adaptative immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21: 511-27.
- 51.** Kaminski NE, Roberts JF, Guthrie FE. A rapid spectrophotometric method for assessing macrophage phagocytic activity. *Immunol Lett.* 1985; 10(6): 329-31.
- 52.** Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000.* 2006; 42: 47-79.
- 53.** Kreikemeyer B, Mclver KS, Podbielski A. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol* 2003; 11(5): 224-32.
- 54.** Kuramitsu HK. Virulence properties of oral bacteria: impact of molecular biology. *Curr Issues Mol Biol.* 2001; 3: 35-6.
- 55.** Kutta H, May J, Jaehne M, Münscher A, Paulsen FP. Antimicrobial defense mechanisms of the human parotid duct. *J Anat.* 2006; 208: 609-19.
- 56.** Lamy MC, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, Pellegrini E *et al.* CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol.* 2004; 54(5): 1250-68.

57. Lee SY, Cisar JO, Bryant JL, Eckhaus MA, Sandberg AL. Resistance of *Streptococcus gordonii* to polymorfonuclear leukocyte killing is a potential virulence determinant of infective endocarditis. *Infect Immun.* 2006; 3148-55.
58. Lei B, DeLeo FR, Hoe NP, Graham MR, Mackie SM, Cole RL, Liu M *et al.* Evasion of human innate and acquired immunity by a bacterial homologue of CD11b that inhibits opsonophagocytosis. *Nat Med* 2001; 7: 1298-1305.
59. Levitzki A, Willinghwn M, Pastan I. Evidence for participation of transglutaminase in receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Set USA.* 1980; 77(5): 2706-10.
60. Liu M, Hanks TS, Zhang J, McClure MJ, Siemsen DW, Elser JL, Quinn MT, Lei B. 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*. *Microbiol.* 2006; 152(Pt 4): 967-78.
61. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50: 353-80.
62. Luft JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961; 9: 409-14.
63. Lungton I. Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic *Mycobacterium*. *Immunol Cell Biol.* 1999; 77(4): 364-72.
64. Mackay RJ, Russel SW. Protein changes associated with stages of activation of mouse macrophages for tumor cell killing. *J Immunol.* 1986; 137: 1392-98.

65. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 323-50.
66. Marcinkiewicz J. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. *Immunopharmacol.* 1997; 37: 35-41.
67. Martin PK, Li T, Sun D, Biek DP, Schmid MB. Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1999; 181: 3666-73.
68. Mattos-Graner RO, Correa MS, Latorre MR, Peres RC, Mayer MP. Mutans streptococci oral colonization in 12-30-month-old Brazilian children over a one-year follow-up period. *J Public Health Dent.* 2001a; 61: 161-67.
69. 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.* 2001b; 69: 6931-41.
70. Mattos-Graner RO, Smith DJ. The vaccination approach to control infections leading to dental caries. *Braz J Oral Sci.* 2004; 3(11): 595-608.
71. Mellman I. Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996; 12: 575-625.
72. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 2000; 16:1-8

- 73.** Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. J Clin Microbiol. 2004; 42: 198-202.
- 74.** Nakano K, Tsuji M, Nishimura K, Nomura R, Ooshima T. Contribution of cell surface antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. Microb Infect 2006; 8:114-21.
- 75.** Navarro-Garcia F, Canizalez-Roman A, Vidal JE, Salazar MI. Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. Microbiol. 2007; 153: 2828-38.
- 76.** Nogueira RD, Alves AC, Napimoga MH, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Characterization of salivary IgA responses in children heavily exposed to the oral bacteria *Streptococcus mutans*: influence of specific antigen recognition in infection. Infect Immun. 2005; 73: 5675-84.
- 77.** Nogueira RD. Estudo prospectivo da resposta imunológica de crianças altamente expostas ao *Streptococcus mutans*: influência da especificidade da resposta imune na infecção [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2006.
- 78.** Nogueira RD, Alves AC, King WF, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ *et al.* Age-specific salivary immunoglobulin A response to *Streptococcus mutans* GbpB. Clin Vaccine Immunol. 2007; 14(6): 804-7.
- 79.** Parham. O sistema Imune. Porto Alegre. Editora Artmed; 2001. p. 372.
- 80.** Popov SV, Popova GY, Ovodova RG, Bushneva OA, Ovodov YS. Effects of polydaccharide from *Silene vulgaris* on phagocytes. Int J Immunopharmacol. 1999; 21: 617-24.

- 81.** Racoosin EL, Swanson JA. M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J Cell Sci.* 1992; 102: 867-80.
- 82.** Rikihisa Y, Zhang Y, Parck J. Inhibition of infection of macrophages with *Ehrlichia risticii* by cytochalasins, monodansylcadaverine, and taxol. *Infect Immun.* 1994; 5: 126-32.
- 83.** Roitt IM, Lehner T. Immunology of oral diseases. Oxford: Blackwell; 2<sup>a</sup> ed. 1983. p. 442.
- 84.** Segura MA, Cleroux P, Gottschalk M. *Streptococcus suis* and group B *Streptococcus* differ in their interactions with murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998; 21: 189-195.
- 85.** 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 *fff* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol.* 2005; 187: 4064-76.
- 86.** Silverstein AM. Darwinism and immunology: from Metchnikoff to Burnet. *Nat Immunol.* 2003; 4: 3-6.
- 87.** Smith DJ, Akita H, King WF, Taubman MA. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 1994; 62: 2545-52.
- 88.** Smith DJ, Taubman MA. Experimental immunization of rats with a *Streptococcus mutans* 59-kilodalton glucan-binding protein protects against dental caries. *Infect Immun.* 1996; 64: 3069-73.

- 89.** Smith DJ, Shoushtari B, Heschel RL, King WF, Taubman MA. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with a catalytic subdomain of mutans group streptococcal glucosyltransferase. *Infect Immun.* 1997; 65: 4424-30.
- 90.** Smith DJ, King WF, Akita H, Taubman MA. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial *mutans* streptococcal infection. *Oral Microbiol Immunol.* 1998; 13: 278-285.
- 91.** Smith DJ, King WF, Godiska R. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. *Infect Immun.* 2001; 69: 3135-42.
- 92.** Smith DJ. Caries vaccines for the twenty-first century. *J Dent Educ.* 2002; 67: 335-49.
- 93.** Smith DJ, King WF, Barnes LA, Peacock Z, Taubman MA. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with putative immunodominant regions of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein B. *Infect Immun.* 2003; 71: 1179-84.
- 94.** Smith DJ, Taubman MA. Vaccines against dental caries infection. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, editors. *New Generation Vaccines.* Marcel Dekk, Inc. New York; 2004. p. 913 -30.
- 95.** Smith DJ, Mattos-graner RO. Secretory Immunity following mutans streptococcal infection or immunization. In: Tim Manser, editor. *Curr Top Microbiol Immunol. Specialization and complementation of humoral immune responses to infection.* Springer. 2005. 319: 131-56.

- 96.** Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies L. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev.* 2005; 206: 149-59.
- 97.** Steele-Mortimer O, Knodler LA, Finlay BB. Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic.* 2000; 1: 107-18.
- 98.** Stipp RN, Höfling JF, Gonçalves RB, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Efeito da inativação de *Vick* e *CovR* no acúmulo da proteína ligante de glucano B (gbpB) em genótipos de *Streptococcus mutans* . In: Congresso Brasileiro de Microbiologia (CBM). Brasília. 2007. [resumo – CD-ROM].
- 99.** Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN. Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69: 183-215.
- 100.** Strober W, James SP. The mucosal immune system. In: Stites DP, Terr AI, Parslow TG, editores. *Basic & Clinical Immunology.* 8<sup>a</sup> ed. Los Altos: Lange Medical Book; 1984. p. 541-55.
- 101.** Sumbly P, Whitney AR, Graviss EA, DeLeo FR, Musser JM. Genome-wide analysis of group a streptococci reveals a mutation that modulates global phenotype and disease specificity. *PLoS Pathog.* 2006; 2(1): e5.
- 102.** Swanson JA. Phorbol esters stimulate macropinocytosis and solute flow through macrophages. *J Cell Sci.* 1989; 94: 135-42.
- 103.** Swason JA, Hoppe AD. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 2004; 76: 1093-1103.

- 104.** Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brow GD, Gordon S. Macrophages receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005. 23: 901-44.
- 105.** Throup JP, Koretke KK, Bryant AP, Ingraham KA, Chalker AF, Ge Y, Marra A *et al.* A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 2000; 35: 566-76.
- 106.** Tsuda H, Yamashita Y, Toyoshima K, Yamaguchi N, Oho T, Nakano Y *et al.* Role of serotype-specific polysaccharide in the resistance of *Streptococcus mutans* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* 2000; 644-50.
- 107.** Ulrich LE, Koonin EV, Zhulin IB. One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends Microbiol.* 2005; 13: 52-6.
- 108.** Ungewickell E, Branton D. Assembly units of clathrin coats. *Nature.* 1981; 289: 420-2.
- 109.** Vadiveloo PK, Vairo G, Hertzog P, Kola I, Hamilton JA. Role of type I interferons during macrophage activation by lipopolysaccharide. *Cytokine Res.* 2000; 12(11): 1639-46.
- 110.** Valentin-Weigand P, Benkel P, Rohde M, Chhatwal GS. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. *Infect Immun.* 1996; 64: 2467-73.
- 111.** Vandenbeuch A., Clapp T.R., Kinnamon S.C. Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci.* 2008; 9(1): 1.

- 112.** von Delwig A, Bailey E, Gibbs DM, Robinson JH. The route of bacterial uptake by macrophages influences the repertoire of epitopes presented to CD4 T cells. *Eur J Immunol.* 2002; 32: 3714-19.
- 113.** Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Vuong C, Kobayashi SD, Porcella SF *et al.* Engagement of the pathogen survival used by *Streptococcus* to avert destruction by innate host defense. *J Immunol.* 2004; 173(2): 1194-201.
- 114.** Welch MD, Mullins RD. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002; 18: 247-88.
- 115.** Wing ED, Remington JS. In: *Basic and clinical Immunology.* 1980; 129-143.
- 116.** Yamashita Y, Bowen WH, Burne RA, Kuramitsu HK. Role of the *Streptococcus mutans gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect Immun.* 1993; 61: 3811-3817.

## ANEXOS



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

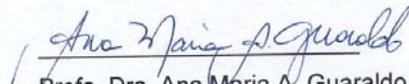
Certificamos que o Protocolo nº 940-1, sobre "ANÁLISE DOS PADRÕES DE INTERNALIZAÇÃO DE GENÓTIPOS DE *Streptococcus mutans* POR MACRÓFAGOS MURINOS" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner/Prof. Dr. Edgard Graner / Thais de Cássia Negrini está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 12 de dezembro de 2005.

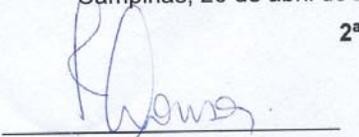
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 940-1, entitled "ANALYSIS OF PATTERNS OF UPTAKE OF *Streptococcus mutans* GENOTYPES BY MURINE MACROPHAGES", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on December 12, 2005.

Campinas, 20 de abril de 2005.

2ª. VIA

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guinaldo  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

  
Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CIDADE UNIVERSITÁRIA ZEFERINO VAZ  
CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 55 19 3788-6359  
FAX 55 19 32893124