



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



1290004930

TCC/UNICAMP
T131a
FOP

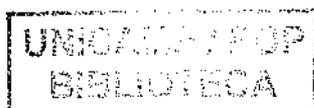
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Tiago Taiete

Orientador(a): Regianne Umeko Kamiya

Ano de Conclusão do Curso: 2009



Regianne Kamiya
Assinatura da Orientadora

Tiago Taiete

**Análise da influência do estresse ácido, nutricional e populacional
na síntese e atividade de substâncias semelhantes às mutacinas
produzidas por isolados clínicos de *Streptococcus mutans*.**

Monografia apresentada ao Curso de
Odontologia da Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas – FOP/UNICAMP, para obtenção
do Diploma de Cirurgião-Dentista

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regianne Umeko Kamiya

Piracicaba, SP
2009

Unidade - FOF/UNICAMP

TCC/UNICAMP

T131a

Vol. _____ Ex. _____

Tombo 4930

C D

Proc. 169-134/10

Preço R\$ 11,00

Data 12/08/10

Req. 768074

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

T131a	<p>Taiete, Tiago. Análise da influência do estresse ácido, nutricional e populacional na síntese e atividade de substâncias semelhantes às mutacinas produzidas por isolados clínicos de <i>Streptococcus mutans</i>. / Tiago Taiete. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009. 83f. : il.</p> <p>Orientador: Regianne Umeko Kamiya. Monografia (Graduação) -- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Antimicrobianos. 2. Biofilme. I. Kamiya, Regianne Umeko. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	---

DEDICATÓRIA

A Deus,

por Sua presença constante em minha vida, por me ajudar a superar cada obstáculo da minha vida com dignidade e esperança.

Aos meus queridos pais, Orlando Taíete e Valéria Aparecida Giacomini Taíete, minha eterna gratidão, pelo amor incondicional e carinho recebido durante toda a minha vida. Em todos os momentos estiveram presentes, incentivando-me e reconfortando-me. Ensinararam-me com seus exemplos a ter responsabilidade, tolerância e honestidade, valores essenciais para trilhar minha vida de maneira digna.

Ao meu estimado irmão Ricardo Taíete, meu grande amigo e companheiro, pelo espírito de luta e honra, que com muito carinho me ajudou a crescer como ser humano. Sou eternamente grato pelos seus incentivos.

Com Carinho,

dedico

AGRADECIMENTOS

À **Profª. Drª. Regianne Umeko Kamiya**, pela confiança, incentivo, paciência e amizade. Agradeço pela orientação, dedicação e por contribuir para a minha formação profissional.

“O mestre e seu discípulo se aproximaram do despenhadeiro.

Então o mestre lhe disse:

- Pule!

E o discípulo lhe disse:

- Tenho medo.

O mestre voltou a repetir:

- Pule!

E então, finalmente, o discípulo pulou e saiu voando”

(Lao Tse)

Minha eterna gratidão, à minha professora, orientadora e amiga!

Ao **Prof. Dr. Reginaldo Bruno Gonçalves**, por me receber no laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP. Por sua confiança, respeito e liberdade com que me orientou nesses quatro anos.

Ao meu amigo **Rodolfo Alberto Pires de Camargo**, pela amizade, pelos momentos de descontração e pelos inúmeros momentos em que me ajudou. Por contribuir imensamente para a realização desse trabalho.

A todos os meus professores que contribuíram de maneira fundamental para a minha formação. Meus agradecimentos, reconhecimento e gratidão.

À todos meus amigos da Microbiologia e Imunologia, alunos da pós-graduação e de iniciação científica, funcionários e professores. Agradeço pela convivência, ensinamentos, ajudas e pela amizade. Obrigado a todos vocês!

Aos meus grandes amigos **Marcos Jaquinta Wood, Pedro Augusto Thiene Leme, Rivaldo Carneiro Firmino Filho, Rodolfo Alberto Pires de Camargo e Vinícius Henrique Alves Ferreira**, pelos momentos de alegria e apoio durante esses anos da graduação.

Às minhas amigas da graduação **Alexsandra Shizue Iwamoto, Aline Soares de Camargo, Larissa Bortoletto Miyata e Samantha Veronez Gonçalves** pela amizade e ajuda.

Aos meus grandes amigos **Larissa Bortoletto Miyata e Pedro Augusto Thiene Leme**, pela amizade, momentos de ajuda e descontração. Por todo apoio e confiança recebido de vocês. Considero vocês meus pilares durante esses quatro anos que passamos juntos!

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão de bolsa e apoio financeiro, ao meu projeto de iniciação científica (Processos 06/60669-8 e 60/60668-1), que originou esta monografia.

Muito obrigado!

"O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos"

(Eleanor Roosevelt)

Sumário

Listas	01
Listas de tabelas	01
Listas de Gráficos	02
Listas de Anexos	02
Listas de abreviaturas, siglas e palavras em outros idiomas	03
Resumo	04
Introdução	05
Revisão de Literatura	05
Objetivos	09
Materiais e Métodos	10
Resultados e Discussão	26
Conclusão	63
Referências Bibliográficas	65
Anexos	72

1. Listas

1.1 Listas de Tabelas

Tabela 1. Relação das cepas produtoras selecionadas para a detecção da atividade antimicrobiana de mutacinas *in vitro*.

Tabela 2. Seqüência dos *primers* para os genes estruturais *mutA*, *nImA* e *nImB* das mutacinas.

Tabela 3. Relação das cepas produtoras, mutacinas produzidas e as respectivas proteínas regulatórias analisadas.

Tabela 4. Seqüência dos *primers* para os genes estruturais *ciaH*, *dgK* e *comD* das proteínas kinases.

Tabela 5. Níveis de transcrição dos genes estruturais das mutacinas I, II, III e IV, em diferentes fases de crescimento e meios de cultura.

Tabela 6. Resultados em unidades arbitrária da concentração inibitória mínima (CIM) e da atividade do extrato (crescimento estatisticamente menor que o controle) da cepa *S. sanguinis* ATCC 15300 submetida a ação dos diferentes extratos brutos.

Tabela 7. Resultados do teste de difusão dos extratos brutos em diferentes pHs (média dos diâmetros de inibição em mm).

Tabela 8. Médias dos diâmetros dos halos inibitórios (em mm) obtidos, após diluição seriada do EBSA e tratamento com proteinase K e seus respectivos controles.

Tabela 9. Diâmetros dos halos inibitórios (em mm) obtidos, após diluição seriada do EBSA e tratamento com saliva diluída e seus respectivos controles.

Tabela 10. Médias dos diâmetros dos halos inibitórios (em mm) obtidos, após diluição seriada do EBCL e tratamento com saliva e seus respectivos controles.

Tabela 11. Resultados em unidades arbitrárias. Atividade antimicrobiana dos diferentes extratos na formação de biofilme de *S. sanguinis* e *S. mutans*.

1.2 Listas de Gráficos

Gráfico 1. Gráfico da produção de mutacinas (medida pelas médias e desvios padrões dos diâmetros de inibição frente diferentes cepas indicadoras) em meios TSA normal e TSA diluído 1 x (TSA ½), em microaerofilia e anaerobiose.

Gráfico 2. Gráfico da produção de mutacinas (medida pelas médias e desvios padrões dos diâmetros de inibição frente diferentes cepas indicadoras) em meios TSA KCl (0,1M) e TSA tamponado em pH 5,5, em microaerofilia e anaerobiose.

Gráfico 3 . Gráfico da expressão relativa do gene estrutural da mutacina III (*mutAIII*) produzida pela cepa C2S4 em diferentes densidades ópticas e meios de cultura.

Gráfico 4. Gráfico da expressão relativa do gene estrutural da mutacina III (*mutAIII*) produzida pela cepa C8D10 em diferentes densidades ópticas e meios de cultura.

1.3 Listas de Anexos

Anexo 1. Médias obtidas das contagens de UFC/ml (em triplicata) das cepas de *S. mutans* produtoras de mutacinas de amplo espectro, em diferentes meios de cultura e microaerofilia (M) ou anaerobiose(A).

Anexo 2. Médias obtidas das contagens de UFC/ml (em triplicata) das cepas indicadoras, em diferentes meios de cultura e microaerofilia (M) ou anaerobiose (A). Anexo 3. Médias dos diâmetros de inibição em mm das cepas indicadoras frente às mutacinas produzidas por isolados de *S. mutans* crescidos em TSA normal e TSA diluído 1 x (TSA ½) em microaerofilia (M) e em anaerobiose (A).

Anexo 4. Médias dos diâmetros de inibição em mm das cepas indicadoras frente às mutacinas produzidas por isolados de *S. mutans* crescidos em TSA KCl (0,1M) e TSA tamponado em pH 5,5 em microaerofilia (M) e em anaerobiose (A).

Anexo 5. Certificado do Comitê de Ética Local em pesquisa.

1.4 Listas de abreviaturas, siglas e palavras em outro idioma

dNTP(s) – Trifosfatos de desoxiribonucleotídeos

et al. – e outros (abreviatura e “et alli”)

g – gramas

In vitro – Conjunto de reações que se realizam em tubos de ensaio ou em condições laboratoriais.

In vivo – Experimento realizado em seres vivos.

KCl – Cloreto de potássio

M – molaridade

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mm – Milímetro

mM – milimolar

mL – mililitro

mV – Milivolts

°C – Grau Celsius

p – Nível de significância

pb – Pares de bases

pCO₂ – Pressão parcial de CO₂

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

pH – Potencial hidrogeniônico

Primer – Iniciadores

Taq polymerase – DNA polimerase isolada de *Thermus aquaticus*

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFC/ml – Unidades Formadoras de Colônias por mL

μ – Micra

μL – Microlitros

2. RESUMO

A maioria dos isolados clínicos de *S. mutans* é capaz de sintetizar substâncias antimicrobianas denominadas mutacinas. Este fator de virulência pode ser essencial na colonização e na prevalência da espécie mais relacionada com o desenvolvimento da cárie dental, principalmente em nichos de alta complexidade ambiental e competitividade microbiana, como o biofilme dental.

Esta pesquisa teve como objetivo principal, analisar a influência de condições ambientais como estresse ácido, nutricional e populacional, na produção de substâncias semelhantes às mutacinas *in vitro*. Os resultados esclareceram os mecanismos fisiológicos de regulação da síntese e/ou atividade de substâncias inibitórias semelhantes às mutacinas, em condições ambientais, comumente descritas em um biofilme cariogênico.

3. Introdução

3.1 Revisão de literatura

Estima-se que a cavidade bucal de um indivíduo adulto hospede cerca de 700 espécies bacterianas distintas. A maioria destas espécies são comensais, mas um subgrupo consiste de patógenos oportunistas que podem causar doenças bucais. Essa complexidade da microbiota que coloniza a cavidade oral dos seres humanos é um reflexo da grande diversidade de ecossistemas disponíveis para o seu desenvolvimento.

Os estreptococos grupo mutans são pertencentes a essa microbiota, e as bactérias deste grupo, em destaque os *Streptococcus mutans*, são considerados os principais agentes etiológicos da cárie dental (WHILEY & BEIGHTON, 1998). Vários fatores predisponentes da doença cárie estão relacionados com características de virulências de *S. mutans*, como por exemplo a produção de glucanos insolúveis em água e de proteínas ligantes de glucanos (Gbps), em presença de sacarose, aumenta a aderência de *S. mutans* na superfície dental promovendo a formação do biofilme cariogênico (SMITH *et al.*, 1994; SATO *et al.*, 1997).

Neste biofilme, o acúmulo de metabólitos ácidos produzidos por *S. mutans*, provoca a desmineralização da superfície do esmalte e a formação de cavitações, tornando o meio seletivo para espécies mais acidúricas (LI *et al.*, 2002). A resistência ao pH ácido e a síntese de bacteriocinas, denominadas mutacinas, podem representar vantagens ecológicas à espécie de *S. mutans*, através do controle e diminuição da população de microrganismos

competidores e sensíveis, na cavidade oral (KITAMURA *et al.*, 1989; GRONRÖOS *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2001b; NAPIMOGA *et al.*, 2005).

Bacteriocinas são proteínas antimicrobianas que algumas bactérias produzem para inibir o crescimento de outras genética e ecologicamente relacionadas (Jacob *et al.*, 1953; TAGG *et al.*, 1976). Diferente dos antibióticos, substâncias inibitórias de amplo espectro de ação produzidas por diversos microrganismos, as bacteriocinas têm pequeno espectro de ação e atuam normalmente sobre cepas da mesma espécie ou sobre cepas de espécies semelhantes à espécie produtora. Entretanto, existem bacteriocinas com maior espectro de ação (Gronroos *et al.*, 1998). Estas substâncias podem agir contra outras espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como conferir vantagens ecológicas em diversas comunidades bacterianas, como na placa dental (Balakrishnam *et al.*, 2002). As bacteriocinas produzidas por *S. mutans* são denominadas mutacinas.

Uma característica marcante de *S. mutans* é que a maioria dos isolados clínicos produz substâncias semelhantes às mutacinas capazes de inibir o crescimento de bactérias genética e ecologicamente relacionadas (JACOB *et al.*, 1953; TAGG *et al.*, 1976; GRÖNROOS *et al.*, 1998; KAMIYA *et al.*, 2005a, b). Existem evidências de que as mutacinas podem exercer um importante papel na proteção e colonização de *S. mutans* na cavidade oral, principalmente em ambientes complexos, como o biofilme dental e lesões de cárie (BALAKRISHNAN *et al.*, 2002; KAMIYA *et al.*, 2005a). A produção destas substâncias *in vivo* sugere vantagens ecológicas à cepa produtora através da substituição da microbiota residente ou prevenção da invasão de microrganismos exógenos (IKEDA *et al.*, 1982; HILLMAN *et al.*, 1984).

Estudos recentes têm relacionado a produção de peptídeos antimicrobianos com o sistema *quorum-sensing* – TCSTS (Sistema de Transdução de Sinal via Dois Componentes), demonstrando o aumento da expressão de genes estruturais em condições de maior densidade celular ou controle da expressão gênica através de mecanismos regulatórios pertencentes a este sistema (QI *et al.*, 2004; HALE *et al.*, 2005; van der PLOEG, 2005; YONEZAWA & KURAMITSU, 2005).

Condições que ocorrem comumente no biofilme, como alta densidade celular e aumento do estresse ambiental, como reduções de pH, oxidação e nutrientes, entre outros fatores ativam o sistema *quorum-sensing*, através do aumento da concentração de peptídeos ferormônios ou sinais que coordenam funções protetoras e de sobrevivência para a célula, que incluem desenvolvimento da competência celular, resistência ao pH ácido e produção de mutacinas (APPLEBY *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2001a, b; van der PLOEG, 2005).

Basicamente, o Sistema TCSTS é realizado através de dois componentes regulatórios consistindo de uma proteína histidina kinase, associada à membrana citoplasmática, e uma segunda proteína regulatória, situada no citoplasma. A proteína histidina kinase capta a presença de peptídeos sinais do ambiente e transmite este sinal através da fosforilação da proteína regulatória, ao qual ativa a transcrição de genes alvos envolvidos na adaptação, sobrevivência e mecanismos de virulência (APPLEBY *et al.*, 1996; FABRET & HOCH, 1999; van der PLOEG, 2005).

Dentre as mutacinas bem caracterizadas, as mutacinas I, II, IV e Smb têm a expressão gênica controlada indiretamente pelo aumento da densidade

celular ou envolvem mecanismos de regulação *quorum sensing* (estudos *in vitro*) (CHEN *et al.*, 1998; QI *et al.*, 2004; van der PLOEG, 2005; YONEZAWA & KURAMITSU, 2005). Foi demonstrado que as proteínas kinases CiaH e ComD, e a proteína DgK são importantes componentes regulatórios que coordenam a expressão dos genes de produção das mutacinas I, IV e II, respectivamente (CHEN *et al.*, 1998; QI *et al.*, 2004; van der PLOEG, 2005). As proteínas kinases também foram correlacionadas com a maior adaptação ao estresse ácido, resistência à bacitracina e desenvolvimento da competência celular. Estes mecanismos regulatórios coadjuvantes podem representar um importante meio de sinalização da expressão de fatores de virulência, relacionados com a sobrevivência das cepas produtoras, principalmente em ambientes complexos e competitivos como o biofilme dental e lesões de cárie.

Estudos *in vitro*, que analisaram a expressão e os mecanismos regulatórios da produção de mutacinas, elucidaram o papel destes antimicrobianos em saliva e/ou biofilme *in vivo*. (KRETH *et al.*, 2004). A maior atividade inibitória das mutacinas detectada em meios sólidos (condição remanescente de biofilme) bem como a significativa expressão gênica em células sésseis versus planctônicas sugere maior atividade biológica destas substâncias em biofilme dental em relação à saliva (KRETH *et al.*, 2004).

Em trabalhos prévios, foi observada que a expressão dos genes estrutural da mutacina tipo I (*mutAI*) foi maior em células aderidas ou sésseis em relação às células planctônicas, *in vitro*, entretanto os mesmos resultados não foram observados para o gene estrutural da mutacina II (*mutAII*) e IV (*nImA* e B). Segundo alguns estudos, os padrões de expressão gênica e conseqüentemente os fenótipos desenvolvidos no estado planctônico e de

biofilme são diferenciados, devido às diferenças ambientais as quais as células bacterianas são expostas (COSTERTON *et al.*, 1995; BURNE *et al.*, 1997; O'TOOLE *et al.*, 2000).

Diante do exposto, este projeto se propôs a analisar a síntese e a atividade antimicrobiana de mutacinas em condições de estresse ácido, nutricional e populacional, objetivando reproduzir características ambientais comumente descritas em um biofilme cariogênico.

3.2 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

1. detectar e comparar a síntese e a atividade de substâncias semelhantes às mutacinas em condições normais ou de estresse ambiental, comumente encontrados em biofilme dental, como oscilação de pH (5,5 a 7,0), depleção de nutrientes, e redução da tensão de oxigênio;
2. analisar a expressão de genes homólogos às mutacinas I, II, III e IV, assim como dos genes homólogos as proteínas regulatórias CiaH, DgK e ComD em culturas de células planctônicas, com diferentes densidades populacionais (D.O. \cong 0,5 e 1,0), submetidas ao pH ácido (5,5) ou neutro (7,0);
3. detectar a atividade biológica de mutacinas pré-purificadas sobre o crescimento planctônico e a formação de biofilme de microrganismos de interesse odontológico.

4. Material e Métodos

4.1. Análise da produção de substâncias semelhantes às mutacinas em diferentes condições ambientais

Foram selecionados 16 fenótipos de *S. mutans*, produtores de substâncias inibitórias de amplo espectro contra estreptococos orais, identificados previamente em isolados de indivíduos cárie-ativos (NAPIMOGA *et al.* 2004; KAMIYA *et al.*, 2005a) e em isolados de pares mãe-filho (FLÓRIO *et al.*, 2004; KLEIN *et al.*, 2004). Para cada fenótipo produtor de mutacinas, foram selecionadas 3 cepas indicadoras de interesse odontológico, que apresentaram sensibilidade moderada ($\cong 25\%$), intermediária ($\cong 50\%$) e alta sensibilidade ($\cong 100\%$), de acordo com o tamanho do diâmetro de inibição, seguindo a fórmula: $[(\text{diâmetro da zona de inibição} - 6 \text{ mm}) : (\text{maior diâmetro da zona de inibição obtido} - 6 \text{ mm})] \times 100\%$ (WU *et al.*, 2004), estabelecidos em estudos prévios (Camargo *et al.*, 2007; Camargo *et al.*, 2008; Taiete *et al.*, 2009a).

A técnica da mutacinotipagem ou método da difusão em agar, foi realizada para avaliar a produção de substâncias semelhantes as mutacinas em diferentes condições ambientais. Para tanto foi utilizado o método do antagonismo proposto e descrito por KAMIYA *et al.* (2005a), com algumas modificações, em microaerofilia e anaerobiose, utilizando-se meio TSA (1,5 ou 0,8%) tamponado com fosfato de sódio 0,1 M em pH 7,0 ou 5,5 (desafio ácido), com o respectivo controle de osmolaridade (KCl a 0,1 M) e meio TSA (1,5 ou 0,8%) não diluído ou diluído 1x (desafio nutricional). No meio diluído 1x (TSA 50%) foram adicionados as mesmas porcentagens de agar-agar e

as concentrações de sais foram normalizadas com base na composição do meio TSB, reduzindo possíveis variáveis.

Cepas de *S. mutans* congeladas em BHI glicerol (10%) foram reativadas em 5 mL de BHI e incubadas a 37°C, 10% CO₂ por 18h. Após acertar a concentração de células (10⁸ UFC/mL, D.O. \cong 0,1 a 550nm) as respectivas culturas de células produtoras foram inoculadas nos meios de cultura das placas de petri através de picadas eqüidistantes. Foram inoculadas 16 cepas produtoras em cada placa, que foi incubada por 48h, em microaerofilia ou anaerobiose. Após este período, as placas foram cobertas com meio contendo 0,8% (5mL) – pour plate - contendo 0,5 mL (10⁸ UFC/mL, D.O. \cong 0,1 a 550nm) de uma cultura *overnight* em TSB (TSB; Difco) de uma cepa indicadora. Após 24h de incubação, nas mesmas condições, o diâmetro da zona de inibição foi medido em mm. Todos os testes foram realizados em duplicata.

As médias dos diâmetros de inibição, obtidas nas diferentes condições avaliadas, foram utilizadas para a análise estatística (Teste t de Student), visando determinar a influência destes fatores ambientais no aumento ou redução da síntese de substâncias semelhantes às mutacinas *in vitro*. Para a análise estatística foram empregadas as médias das zonas de inibição de 3 cepas indicadoras (de baixa, média e alta sensibilidade às mutacinas) para cada cepa produtora.

Os halos de inibição obtidos na mutacिनotipagem dependem da capacidade de difusão dos antimicrobianos e do grau de sensibilidade da cepa indicadora, assim são diretamente relacionados com o número de células produtoras e indicadoras, respectivamente, capazes de crescer em

determinada condição. Para que a capacidade de crescimento das cepas produtoras e indicadoras não interferisse nos tamanhos dos halos inibitórios, obtidos nas diferentes condições, o inóculo inicial tanto da cepa produtora como da cepa indicadora foi padronizado para que fosse obtido um crescimento na mesma potência de 10 em cada uma das condições testadas.

Para tanto, as cepas produtoras e indicadoras selecionadas foram crescidas em TSB (5mL) por 12 h, a 37°C, em microaerofilia (D.O. \cong 0,5, metade da fase log). As culturas foram diluídas serialmente e plaqueadas em TSA nas diferentes condições de pH e concentração de nutrientes, sendo cada triplicata incubada em anaerobiose ou microaerofilia por 48h. Foi seguido o protocolo da técnica da micropipeta (WESTERGREN & B. KRASSE, 1978), aplicando-se 25 μ l de cada diluição em triplicata sobre o meio de cultura. As colônias foram contadas para a determinação do número de UFC/ml, em cada condição testada. Duas variáveis foram comparadas somente quando o número de células (UFC/mL), que potencialmente cresceram nas diferentes condições, foi aproximado, na mesma potência de 10. Como controle da capacidade de crescimento das cepas, nas diferentes condições testadas, o mesmo inóculo inicial utilizado na Mutacintipagem foi diluído serialmente e plaqueado em TSA em diferentes pHs e concentrações de nutrientes, e as triplicatas foram incubadas em microaerofilia ou anaerobiose, até o final dos experimentos. As unidades formadoras de colônias foram novamente contadas nas diferentes condições para confirmar que em cada situação testada, o crescimento das cepas produtoras e indicadoras, potencialmente, foi o mesmo.

4.2.1. Análise da expressão das mutacinas I, II, III e IV frente ao estresse ácido e populacional

Para a análise da expressão gênica de mutacinas caracterizadas foi empregada a técnica de RT-PCR semi-quantitativa. Cerca de 2 isolados produtores de mutacinas tipos I, II, III ou IV, identificados em estudos prévios (KAMIYA et al., 2008) foram selecionados para a análise da expressão gênica sob estresse ácido e populacional. No total, foram analisados 6 isolados clínicos, sendo cada tipo de mutacina representado ao menos por 2 isolados distintos. (Obs: 1 cepa expressou positivamente os genes estruturais das mutacinas tipos I e II; enquanto duas outras cepas expressaram positivamente os genes das mutacinas I e IV). As cepas produtoras selecionadas e o tipo de mutacina produzida está listado na tabela 1.

Tabela 1. Relação das cepas produtoras selecionadas para a detecção da atividade antimicrobiana de mutacinas *in vitro*.

Cepas produtoras	Mutacinas produzidas
C7(5)1	I e II
C18(10)6	II
C1S2	I e IV
C8D10	III
C2S4	III
C9S9	I e IV

Os níveis de transcrição dos genes estruturais das respectivas mutacinas foram mensurados por densitometria em gel de agarose a 2%, nas diferentes condições ambientais testadas.

As cepas foram crescidas em microaerofilia, a 37°C em 5 ml de meio TSB tamponado (pH 5,5 ou 7,0 além do controle de osmolaridade – TSB com KCl a 0,1M). A curva de crescimento de cada cepa foi monitorada por espectrofotometria a 560 nm e o pH em diferentes tempos das curvas de crescimento foi monitorado em pHmetro. Culturas com densidades ópticas de 0,5 e 1,0, em pH 5,5 ou pH 7,0 e TSB KCl 0,1M foram centrifugadas sendo as células submetidas à extração de RNA total. Os testes foram realizados em duplicata.

4.2.2. Extração de RNA

O RNA total foi extraído com o kit de extração de RNA (RNeasy kit QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante, com algumas modificações. A extração de RNA foi realizada com aliquotas de 1,5 ml (DO = 1,0) a 3 ml (DO = 0,5) de cultura que foram centrifugadas (10000 rpm, 4°C, 8min) e os pellets de células foram lisados com lisozima (20 mg/μL) em banho maria a 37°C por 30

min, vortexando em intervalos de 5 min. Após a centrifugação a 4°C, o RNA foi extraído com os tampões do kit e o pellet de RNA foi resuspenso em 35 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC). Após a extração do RNA realizou-se análise qualitativa das amostras de RNA através de eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA residual presente na amostra de RNA extraído foi removido com DNase I (Life Technologies-Gibco), seguindo-se as recomendações do fabricante. Para tanto, a cada 12 ng de RNA, foi adicionado Tampão de reação 10x, DNase I e água DEPC para 44 µL. A suspensão foi incubada a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, foi adicionado 1 µL de EDTA para inativar a DNase com incubação a 65°C por 10 min (em termociclador).

As concentrações e pureza do RNA foram determinadas após tratamento com DNase I, pois o kit extraía DNA concomitantemente com RNA, o que podia ser visualizado em gel de agarose, a presença de bandas adicionais de DNA, além das leituras em espectrofotômetro variarem muito. As concentrações e pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria a 260 nm e 280 nm, respectivamente, e sua integridade confirmada através da visualização em géis corados em brometo de etídio (0.3 mg/mL).

4.2.3. Síntese de cDNA

Para cada cepa produtora foram realizadas 12 extrações de RNA de 6 condições em duplicata: a) controle TSB adicionado de KCl 0,1M (D.O 0,5 e

D.O 1,0); b) TSB pH 5,5 (D.O 0,5 e D.O 1,0); e c) TSB pH 7,0 (D.O 0,5 e D.O 1,0).

O RNA total (12 ng) tratado com DNase foi submetido à Transcrição Reversa (RT) com a enzima Super Transcrip^t RT III (Life Technologies – Gibco) e um Mix de *primers* randômicos (20 μ M) Ea1, Ea7, Es1, Es3 e Es8 (CHIA *et al.*, 2001), para a síntese de cDNA.

Inicialmente, foi adicionado ao RNA total (12 ng), o Mix de *primers* randômicos (20 μ M), dNTPs (10 mM) e água DEPC para 10 μ L. A mistura foi submetida a temperatura de 65°C por 5 min e a 4°C por 1 min. A segunda fase de síntese de cDNA consistiu na adição de tampão RT 10x, MgCl₂ (25 mM), DTT (0,1 M), RNase OUT (40 U/ μ L) e a enzima Super Transcrip^t RT III (200 U/ μ L). O volume total dos reagentes (17 μ L) foi submetido ao ciclo térmico: 25°C/10min; 50°C/50min; 85°C/5min e 4°C/1min.

Antes de se realizar a amplificação por PCR realizou-se a curva de expressão para cada par de primers das mutacinas I, II, III e IV (esta última constituída dos genes *nImA* e *nImB*). Utilizando-se para isso o cDNA sintetizado a partir de 12 ng de RNA total extraído das cepas produtoras dessas mutacinas, submetendo-se de 20 a 60 ciclos térmicos (94°C/45seg, 50°C/1min e 72°C/5min). A curva de expressão foi delineada a partir da densitometria das bandas eletroforéticas. Identificando-se o número ótimo de ciclos na metade da curva, para que assim não haja saturação da reação de PCR dado por um número muito superior de ciclos térmicos, ou quantificações subestimadas advindo de um número muito inferior de ciclos.

4.2.4. RT-PCR

Cerca de 1 μ L da reação contendo cDNA foram utilizados como *template* para amplificação por PCR (reação para 25 μ L), juntamente com 50 mM de $MgCl_2$, 0.3mM de cada *primer* específico, 200 μ M de dNTPs, 1.25 unidades de Taq polimerase (Life Technologies - Gibco) e tampão para PCR 10x; os testes foram realizados em triplicata de cada duplicata.

Após a desnaturação inicial (94°C por 2 min), as amplificações foram realizadas através de 37 ciclos térmicos (94°C/45seg, 50°C/1min e 72°C/5min), seguido de extensão final a 72°C/7min. Os produtos da PCR (10 μ L) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 1 x, corado com brometo de etídio (0,3 μ g/ml). Foi realizada a densitometria das bandas, normalizando a absorbância em relação ao gene de referência 16S (igualmente expresso em todas as condições ambientais testadas) de cada cepa produtora na mesma condição de meio de cultura e de densidade populacional. Foram utilizados controles da síntese de cDNA com reações sem a transcriptase reversa, para verificar a existência de DNA residual ou contaminante em cada amostra.

4.2.5. *Primers* específicos para os genes estruturais

As seqüências dos genes estruturais *mutA* das mutacinas I, II, III e IV, bem como as seqüências do gene 16S foram utilizadas para delinear os *primers* específicos (KAMIYA et al., 2008). Os *primers* delimitaram regiões específicas de até 200 pares de bases, para otimizar os resultados do RT-PCR (tabela 2). Todas as seqüências foram obtidas no Gene Bank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e os delineamentos dos oligonucleotídeos foram desenvolvidos no programa Primer 3 (<http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>).

Tabela 2. Seqüência dos *primers* para os genes estruturais *mutA*, *nlmA* e *nlmB* das mutacinas.

<i>Primers</i>	Seqüências	Mutacina	Gene Bank	Amplificado
<i>mutAI_Foward</i>	TAGAAGTCCTTGGTACTGAA	I	AF238860	163pb
<i>mutAI_Reverse</i>	TTGAAACTAGGATTTTTCAC	I		
<i>mutAII_Foward</i>	CAGTAACGCAGTAGTTCCTT	II	U40620	162pb
<i>mutAII_Reverse</i>	TTAACAGCAAGTGAAAACAT	II		
<i>mutAIII_Foward</i>	CAATAATTAGAAGTCCTTGG	III	AF154675	194pb
<i>mutAIII_Reverse</i>	AAGGACAGGTAGTTTCAATA	III		
<i>nlmAIV_Foward</i>	CAATTTGATGTAATGGACAG	IV	baseado no genoma do <i>S. mutans</i> UA 159	154pb
<i>nlmAIV_Reverse</i>	CTACACAATATGGGGTAACA	IV		
<i>nlmBIV_Foward</i>	AGTTTTGGTGGAGATAAAC	IV	(NC004350)	156pb
<i>nlmBIV_Reverse</i>	GGAAAACTACAGATCCAA	IV		
16S_Foward	TATCTTCCTCAATTAACCA	-	NP722374	181pb
16S_Foward	TAGTTAAGATTGCCAGTGAT	-		

4.3.1. RT-PCR para os genes regulatórios

Foi realizado a técnica de RT-PCR semi-quantitativo descrito nos itens acima para os genes regulatórios, *ciaH*, *dgK* e *comD*, que regulam a expressão das mutacinas I, II e IV respectivamente.

Para tanto, foi utilizado os mesmos reagentes e os mesmos cDNAs empregados para verificar a influência do estresse ácido e populacional na

expressão dos genes estruturais das mutacinas caracterizadas. Foi realizada a densitometria das bandas, normalizando a absorbância em relação ao gene de referência 16S (igualmente expresso em todas as condições ambientais testadas) de cada cepa produtora na mesma condição de meio de cultura e de densidade populacional. As cepas produtoras analisadas, assim como a mutacina produzida e a proteína regulatória envolvida no processo de expressão da bacteriocina estão listadas na tabela 3.

Tabela 3. Relação das cepas produtoras, mutacinas produzidas e as respectivas proteínas regulatórias analisadas.

Cepa produtora	Mutacina produzida	Proteína Regulatória
C7(5)1	I	CiaH
C7(5)1	II	DgK
C18(10)6	II	DgK
C1S2	I	CiaH
C1S2	IV	ComD
C9S9	I	CiaH
C9S9	IV	ComD

4.3.2. *Primers* específicos para os genes regulatórios

As seqüências dos genes *ciaH*, *dgK* e *comD*, bem como as seqüências do gene 16S foram utilizadas para delinear os *primers* específicos (KAMIYA et al., 2008). Os *primers* delimitaram regiões específicas de até 200 pares de bases, para otimizar os resultados do RT-PCR (tabela 4). Todas as seqüências foram obtidas no Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e os delineamentos dos oligonucleotídeos foram desenvolvidos no programa Primer 3 (<http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>).

Tabela 4. Seqüência dos *primers* para os genes estruturais *ciaH*, *dgK* e *comD* das proteínas kinases.

<i>Primers</i>	Seqüências	Gene Bank	Amplificado
<i>ciaH</i> _Forward	AATATGGAGGTAATAAAGAC	Baseado	
<i>ciaH</i> _Reverse	AATATGGAGGTAATAAAGAC	no genoma da cepa	183pb
<i>dgK</i> _Forward	AGAAGAGCGTAATATGAAAA	<i>S. mutans</i>	
<i>dgK</i> _Reverse	AACATGGAAAAATGATAGTC	UA 159	192pb
<i>comD</i> _Forward	GTTATAATATCGGCCATCTA	(NC004350	
<i>comD</i> _Reverse	GSTATGGTAATGAAATCAAGC)	162pb
16S_Foward	TATCTTCCTCAATTAACCA	NP722374	
16S_Reverse	TAGTTAAGATTGCCAGTGAT		181pb

4.4. Estatística

O teste ANOVA foi empregado para comparar a expressão dos genes de produção das mutacinas e das proteínas regulatórias em células submetidas aos pHs 7,0 e 5,5 (estresse ácido) em relação ao controle KCl (0,1 M) e às densidades celulares de 0,5 e 1,0 (estresse populacional).

4.5. Detecção da atividade antimicrobiana de mutacina(s) *in vitro*

Anteriormente à realização da extração das mutacinas, foi verificado o perfil de sensibilidade de cepas indicadoras às mutacinas caracterizadas produzidas pelas cepas produtoras selecionadas (tabela 1), tendo como objetivo a seleção de uma cepa indicadora altamente sensível às diversas mutacinas, para serem empregadas nas metodologias descritas abaixo. Para isto foi realizado o método do antagonismo proposto e descrito por KAMIYA *et al.* (2005a), com algumas modificações. As cepas indicadoras

utilizadas foram: *S. sanguinis* ATCC 15300 e *S. sanguinis* M5. Os testes foram realizados em duplicata. Assim, a cepa indicadora que se apresentou mais sensível às mutacinas produzidas pelas cepas produtoras foi selecionada.

Segundo a CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute) o pH do meio pode influenciar no aumento ou redução da atividade inibitória de determinada droga antimicrobiana. Para testar o efeito do pH ambiental na atividade de substâncias semelhantes às mutacinas, foram empregadas mutacinas pré-purificadas no método da concentração inibitória mínima (CIM) e da difusão em agar com meio TSA tamponado em pH 5,5 e 7,0.

Alíquotas de 200µL das cepas produtoras congeladas em BHI glicerol (10%) foram inoculadas em 200 mL de TSB, sendo então incubado em microaerofilia por 18 h. Após a remoção das células por centrifugação (8000 rpm, 2°C, 8 min) as proteínas do sobrenadante foram precipitadas com sulfato de amônia (40%) a 4° C *overnight*. Sendo após esse período centrifugado novamente (9200 rpm, 2°C, 25 min); ao pellet de proteínas formado após a centrifugação foi adicionado 12 ml de água destilada deionizada, sendo dissolvido com auxílio de um sonificador. A extração seguiu-se adicionando igual volume de clorofórmio seguindo o protocolo de Qi *et al.* (1999), após homogeneização e centrifugação (10000 rpm, 4°C, 1 minuto) a interface de proteínas formada entre o meio de cultura e o clorofórmio foi recuperada e lavada em água destilada deionizada por duas vezes. O pellet foi armazenado a -20 C.

O pellet dissolvido em água MilliQ foi diluído serialmente (1:1 – diluição serial 2) em tampão fosfato de sódio, em pH 5,5 e 7,0 em placas de

microtitulação de Elisa. Meio TSB 2X concentrado, contendo 10^5 UFC/mL da cepa indicadora *S. sanguinis* ATCC 15300 (de alta sensibilidade às mutacinas pré-purificadas, baseando-se em resultados da técnica de mutacinotipagem – metodologia acima) foi adicionado às microdiluições seriadas. As microplacas foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 24 horas. O leitor de Elisa a 550nm foi utilizado para monitorar o crescimento das cepas indicadoras, comparando-se as densidades ópticas antes e após a incubação, sendo então determinada a CIM (em Unidades Arbitrárias – UA), que foram comparadas nos diferentes pHs, para cada extrato bruto utilizado. Para esta metodologia, a CIM das substâncias semelhantes às mutacinas, em determinado pH, foi expressa em UA, que foi definida como a maior diluição da droga que inibiu totalmente o crescimento da cepa indicadora testada, em relação ao controle. Os resultados obtidos elucidaram o papel do pH do meio na atividade inibitória de substâncias semelhantes às mutacinas.

Para verificar a influência do pH na capacidade de difusão de substâncias semelhantes às mutacinas em agar, o método da difusão em agar foi empregado, seguindo o protocolo de Qi *et al.* (1999). Aliquotas de 25 μ L das mutacinas pré-purificadas, diluídas serialmente (1:1 – diluição serial 2) nos tampões com pH 5,5 ou 7,0, foram depositadas sobre a superfície do meio TSA tamponado nos respectivos pHs, e após a secagem foi vertido sobre a placa 5 mL de TSB a 0,8% em pH 5,5 ou 7,0 contendo um inoculo com 10^8 UFC/mL de uma cultura overnight da cepa indicadora *S. sanguinis* ATCC 15300. As placas de petri foram incubadas em microaerofilia (10% PCO₂, 37°C) por 24 horas; após o período de incubação os diâmetros

dos halos inibitórios foram determinados em milímetro, e os resultados obtidos nos pH 5,5 e pH 7,0 para o mesmo extrato foram comparados, esclarecendo se o pH influí na difusão das substâncias semelhantes as mutacinas. Nesta metodologia, a CIM foi determinada em UA, sendo uma unidade arbitrária definida como a menor concentração da substância semelhante à mutacina capaz de produzir halo inibitório ≥ 4 mm.

Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.6. Detecção da atividade antimicrobiana de mutacina(s) *in vitro*

– o papel das proteases

Para verificar se a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos é de origem protéica (mutacinas), ou pela ação de algum composto utilizado na extração das mutacinas ou outra(s) substância(s) não protéicas do metabolismo bacteriano, foi realizado o tratamento dos extratos brutos obtidos após precipitação com sulfato de amônia (EBSA) com proteinase K com concentração final de 2mg/ml, ficando as amostras incubadas por um período de 2 horas a 37°C, sendo em seguida fervidas a 100° C por 5 minutos para inativar a proteinase K (protocolo de Busarcevic et al., 2008 com modificações). Como controle foi utilizado o extrato adicionado de proteinase K na mesma concentração final sendo em seguida fervido a 100°C por 5 minutos para inativar a proteinase K, no tempo 0 (zero), este mesmo controle foi incubado por 2 horas a 37° C, após a inativação da proteinase. Após a fervura, as amostras foram resfriadas naturalmente a temperatura ambiente. Após isso, os extratos foram diluídos serialmente (1:1, diluição serial 2), e alíquotas de 25 μ L foram plaqueadas em TSA e realizado o pour-plate com a cepa indicadora S.

sanguinis ATCC 153000. Após 24 horas de incubação em microaerofilia foi verificado a presença ou ausência dos halos de inibição.

Para verificar o papel das proteases salivares sobre as mutacinas contidas nos extratos realizou-se a metodologia anteriormente descrita, entretanto sendo utilizado saliva ao invés da proteinase k. Adicionou-se a mesma quantidade de extrato bruto obtido após precipitação com sulfato de amônia (EBSA) e de saliva, sendo então incubadas por 37°C por 2 horas e logo em seguida fervidas por 5 minutos a 100°C. Como controle foi utilizado o respectivo extrato adicionado de saliva, que no tempo 0, foi fervido a 100°C por 5 minutos para inativar a proteases, sendo posteriormente incubado por 2 horas a 37° C. Como a saliva foi diluída 1x ao ser adicionada em mesmo volume de EBSA, realizou-se a mesma metodologia descrita com o pellet de proteínas que foi obtido após a extração com clorofórmio (EBCL), desta maneira as proteínas salivares estariam em concentrações mais próximas das encontradas *in vivo*. Todas as amostras foram resfriadas naturalmente a temperatura ambiente. As amostras foram diluídas serialmente (1:1) e alíquotas de 25 µL de cada diluição foram plaqueadas em TSA sendo em seguida realizado o pour-plate com a cepa indicadora. Após 24 horas de incubação foi verificado a presença ou ausência de halos de inibição. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Os resultados foram expressos em UA.

4.7. Atividade antimicrobiana no desenvolvimento do biofilme bacteriano *in vitro*

O extrato bruto foi diluído serialmente em tampão fosfato de sódio, pH 5,5 e 7,0 em placas de microtitulação de Elisa. Meio THB sacarose 2X concentrado, contendo 10^5 UFC/mL da cepa indicadora *S. sanguinis* ATCC 15300 ou da cepa indicadora *S. mutans* UA 130 (cepa de resistência moderada as mutacinas – Camargo et al., 2007; Camargo et al., 2008; Taiete et al., 2009) foi adicionado às microdiluições seriadas. As microplacas foram incubadas a 10% PCO₂, 37°C por 18 horas. Após esse período alíquota de 150 µL da cultura de cada diluição foi transferida para outra placa de microtitulação de Elisa e o crescimento planctônico da cepa indicadora foi mensurado no leitor de Elisa a 550nm, comparando-se as densidades ópticas antes e após ao período de incubação. A atividade das mutacinas sobre o crescimento planctônico das cepas *S. sanguinis* ATCC 15300 e *S. mutans* UA 130 foi analisado através de comparações com o crescimento planctônico apresentado pelo controle (células não submetidas à ação do extrato bruto).

A formação do biofilme foi quantificada pelo método de evidenciação de células aderidas ao poliestireno com cristal violeta, seguindo descoloração com álcool etílico 98% e leituras da absorbância a 575 nm em leitor de Elisa (O'TOOLE & KOLTER, 1998).

O restante do sobrenadante foi descartado, e a placa de microtitulação foi lavada duas vezes em água destilada. Foi então adicionado 150 µL de cristal violeta 1%, deixando-se agir então 30 minutos para evidenciar a formação de biofilme, sendo então descartado o corante e a placa lavada três vezes em água destilada, deixando-se para serem secas a temperatura

ambiente por duas horas. Após esse período foi adicionado 200 μ L de etanol 98% (Merck) para descorar a placa por um período de três minutos, sendo então transferidos 150 μ L do sobrenadante corado para outra placa de microtitulação e levada ao leitor de Elisa para medir a absorbância a 575nm. A atividade biológica das mutacinas na inibição da formação do biofilme de espécies sensíveis foi detectada através de comparações com o biofilme formado em solução controle.

5. Resultados e Discussão

5.1. Análise da produção de substâncias semelhantes às mutacinas em diferentes condições ambientais

Os anexos 1 e 2 demonstram os resultados obtidos pela contagem de UFC/mL em diferentes condições ambientais. A análise do crescimento foi realizada em triplicata, sendo obtidos resultados semelhantes. A produção de mutacinas em diferentes condições ambientais apenas foi comparada quando o crescimento nesses meios foi estatisticamente semelhante.

O anexo 3 demonstra os resultados obtidos pela mutacinotipagem em meio TSA normal e TSA diluído 1x (TSA $\frac{1}{2}$), em condições de anaerobiose e microaerofilia. As médias dos halos inibitórios foram analisadas estatisticamente (Student t) revelando maior produção de mutacinas em TSA normal ($p < 0,05$), tanto em microaerofilia como em anaerobiose (gráfico 1). Considerando que as taxas de crescimento das cepas produtoras e

indicadoras não se diferenciaram nos meios TSA concentrado e diluído 1x, conclui-se que a composição do meio de cultura é essencial para a síntese de substâncias semelhantes às mutacinas e que o estresse nutricional pode reduzir a produção das bacteriocinas por *S. mutans*.

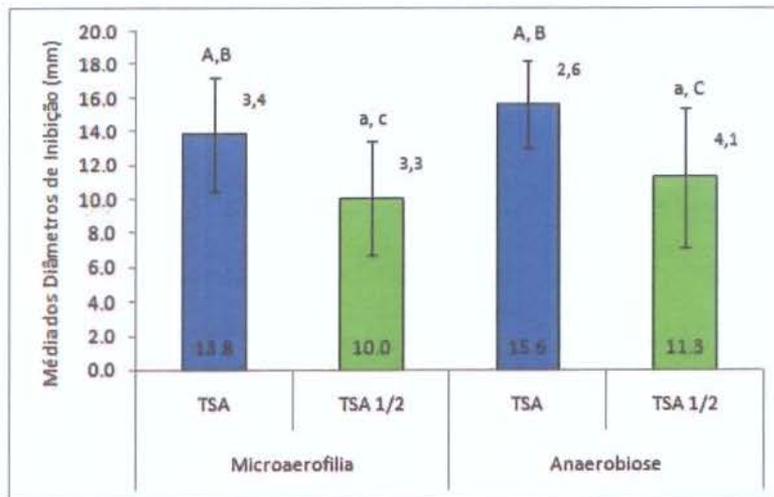


Gráfico 1. Gráfico da produção de mutacinas (medida pelas médias e desvios padrões dos diâmetros de inibição frente diferentes cepas indicadoras) em meios TSA normal e TSA diluído 1 x (TSA 1/2), em microaerofilia e anaerobiose.

* Letras iguais, maiúsculas e minúsculas revelam diferenças estatisticamente significantes entre si ($p < 0,05$, teste de Student).

A redução da síntese de bacteriocinas em situações de depleção nutricional pode basear-se na teoria da economia de energia celular. Segundo RILEY & WERTZ (2002), a síntese de bacteriocinas ou lantibióticos requer alto gasto de energia, com a expressão de 6 a 11 genes pertencentes ao *locus* de biossíntese de antimicrobianos, entre eles, genes relacionados com a transcrição de pré-peptídeos, de proteínas modificadoras pós-traducionais, de proteínas envolvidas no transporte e na imunidade ao

antimicrobiano secretado. Em casos extremos de estresse nutricional, a redução da síntese de bacteriocinas pode ser importante para a sobrevivência da cepa produtora, principalmente em ambientes complexos e competitivos, como o biofilme dental (Taiete et al. 2007; Taiete et al., 2009a).

Em recente estudo de KRETH *et al.* (2005), observou-se maior síntese de mutacinas pela cepa *S. mutans* UA140 em meio BHA diluído 1 x (BHI 50%) em relação ao meio BHA enriquecido com sacarose e tamponado em pH 7.0. Entretanto, os autores não compararam a síntese de mutacinas entre meio BHA normal sem tamponamento e BHA 50% e empregaram uma técnica de antagonismo diferente, dificultando possíveis comparações com o presente estudo.

Ao analisar a produção de mutacinas em meios de cultura tamponados com pH 5,5 e 7,0 em relação ao controle (TSA com KCl 0,1M) (anexo 4), verificou-se a ausência de halos inibitórios em meio TSA tamponado com pH 7,0 (resultados não descritos na tabela do anexo 4). Nenhuma cepa produtora apresentou capacidade inibitória nesta condição, indicando a impossibilidade da produção da síntese de mutacinas em pH neutro e estável ou possível interferência na atividade biológica ou na capacidade de difusão das bacteriocinas em meio sólido. Nos testes realizados no item 4.5, verificou-se que em pH houve difusão de mutacinas pelo agar, entretanto especula-se que o pH externo influencie na adsorção das moléculas antimicrobianas na membrana de células produtoras. Segundo GUERRA & PASTRANA (2003) e WU *et al.* (2004) pHs mais baixos diminuem a capacidade de adsorção de bacteriocinas na membrana de células produtoras, podendo contribuir na difusão dos peptídeos no meio.

A produção de mutacinas em meio não tamponado (TSA + KCl 0,1 M) foi estatisticamente maior em relação ao meio TSA pH 5,5 (gráfico 2), tanto em microaerofilia como em anaerobiose, concordando com resultados obtidos em estudos anteriores de GUERRA & PASTRANA (2003). Neste trabalho, foi observado maior síntese de nisina e pediocina em meios não tamponados, cuja queda de pH foi mais acelerada em relação aos meios tamponados, sugerindo que a ΔpH (*pH drop*) influencia positivamente na produção de bacteriocinas.

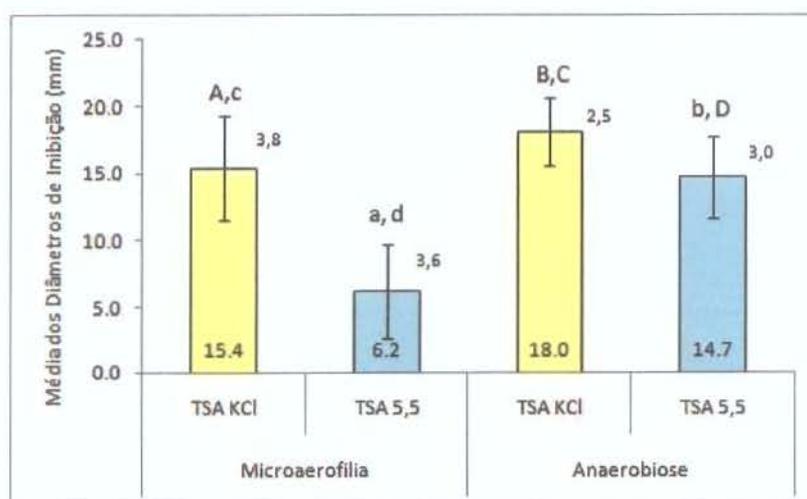


Gráfico 2. Gráfico da produção de mutacinas (medida pelas médias e desvios padrões dos diâmetros de inibição frente diferentes cepas indicadoras) em meios TSA KCl (0,1M) e TSA tamponado em pH 5,5, em microaerofilia e anaerobiose.

* Letras iguais, maiúsculas e minúsculas revelam diferenças estatisticamente significantes entre si ($p < 0,05$, teste de Student).

A síntese de mutacinas em anaerobiose foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) em meios TSA diluído 1x, TSA contendo KCl (0,1M) e TSA (pH 5,5) em relação a microaerofilia, possivelmente devido a maior queda de pH

determinada pela produção mais elevada de ácidos provenientes da fermentação da glicose (presente no meio TSB), metabolicamente predominante em ambientes anaeróbios (gráficos 1 e 2) (Taiete et al., 2007; Taiete et al., 2009a). Em condição anaeróbia, a maioria das cepas produtoras apresentou maior taxa de crescimento em relação à condição microaeróbia (anexo 1).

5.2.1. Análise da expressão das mutacinas I, II, III e IV frente ao estresse ácido e populacional

A curva de crescimento de cada cepa produtora de mutacina nos diferentes meios empregados (TSB tamponado com tampão fosfato em pH 7,0, pH 5,5 e o controle de osmolaridade TSB com KCl 0,1M), foi monitorada através de espectrofotometria a 560nm.

5.2.2. Extração de RNA

Foram realizadas 72 extrações de RNA utilizando o kit de extração de RNA (RNAeasy kit QIAGEN). Após as extrações, alíquotas de 5 ul do RNA extraído foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,3 µg/ml). Onde foi possível verificar a qualidade do produto obtido pela extração, sendo encontrado RNA em todas as amostras.

Após o tratamento com DNase para a eliminação do DNA residual, foi determinado a pureza e a concentração de RNA através de espectrofotometria em 260nm e 280nm. Alíquotas de 10uL das amostras

tratadas foram novamente analisadas por eletroforese em gel de agarose 2%, para observar possível degradação do RNA durante o tratamento com DNase, assim como a efetividade do tratamento em eliminar o DNA residual.

5.2.3. Síntese de cDNA

Preliminarmente à execução do RT-PCR realizou-se a curva de expressão dos pares de *primers* das mutacinas I, II, III e IV, utilizando para isso o cDNA sintetizado a partir do RNA extraído das cepas produtoras.

Sendo determinado 37 ciclos para todos os genes analisados.

5.2.4. RT-PCR para os genes estruturais das mutacinas e para os genes regulatórios

Tabela 5. Níveis de transcrição dos genes estruturais das mutacinas I, II, III e IV, em diferentes fases de crescimento e meios de cultura:

Cepa Produtora	Genes	Unidade relativa (UR) de expressão dos genes estruturais e regulatórios em diferentes fases de crescimento ¹ e diferentes meios de cultura					
		Metade da Fase log			Final da Fase log		
		Densidade Populacional (D.O. \cong 0,5)			Densidade Populacional (D.O. \cong 1,0)		
		Controle ²	pH 5.5	pH 7.0	Controle ²	pH 5.5	pH 7.0
C1S2	<i>mutAI</i>	39 \pm 0.04	24 \pm 0.03	28 \pm 0.04	74 \pm 0.12*	28 \pm 0.04	30 \pm 0.04
	<i>ciaH</i>	54 \pm 0.04*	43 \pm 0.02	30 \pm 0.03	8 \pm 0.01	21 \pm 0.03	48 \pm 0.06*
C9S9	<i>mutAI</i>	16 \pm 0.02	24 \pm 0.05	33 \pm 0.07*	64 \pm 0.02	38 \pm 0.07*	7 \pm 0.01
	<i>ciaH</i>	-**	-	-	-	-	-
C7(5)1	<i>mutAI</i>	23 \pm 0.04	35 \pm 0.03	31 \pm 0.04	53 \pm 0.04*	50 \pm 0.03	43 \pm 0.05
	<i>ciaH</i>	98 \pm 0.02	96 \pm 0.05	94 \pm 0.03	90 \pm 0.03*	69 \pm 0.00	64 \pm 0.09
C7(5)1	<i>mutAII</i>	42 \pm 0.01	30 \pm 0.04	21 \pm 0.03	47 \pm 0.03*	21 \pm 0.01	38 \pm 0.04
	<i>dgcK</i>	58 \pm 0.02	91 \pm 0.02	98 \pm 0.03*	72 \pm 0.04	89 \pm 0.07	88 \pm 0.01
C18(10)6	<i>mutAII</i>	31 \pm 0.03	36 \pm 0.01	50 \pm 0.00	74 \pm 0.12*	40 \pm 0.04	49 \pm 0.02
	<i>dgcK</i>	61 \pm 0.05	57 \pm 0.04	22 \pm 0.04	68 \pm 0.09*	16 \pm 0.02	62 \pm 0.00
C1S2	<i>nlmA</i>	125 \pm 0.12	114 \pm 0.09	108 \pm 0.10	216 \pm 0.18*	126 \pm 0.10	103 \pm 0.12
	<i>nlmB</i>	137 \pm 0.15	171 \pm 0.11	114 \pm 0.06	192 \pm 0.10*	120 \pm 0.11	122 \pm 0.09
	<i>comD</i>	100 \pm 0.02*	89 \pm 0.04	58 \pm 0.02	92 \pm 0.00	43 \pm 0.04	58 \pm 0.01
C9S9	<i>nlmA</i>	126 \pm 0.07	86 \pm 0.06	129 \pm 0.06	225 \pm 0.17*	100 \pm 0.18	103 \pm 0.13
	<i>nlmB</i>	109 \pm 0.07	131 \pm 0.07*	117 \pm 0.06	129 \pm 0.02*	105 \pm 0.02	123 \pm 0.05
	<i>comD</i>	79 \pm 0.05	99 \pm 0.01*	94 \pm 0.06	71 \pm 0.07	90 \pm 0.03	94 \pm 0.02

¹valores representativos de dois experimentos independentes. Valores de UR multiplicados por 100.

²controle = meio TSB contendo KCl a 0,1M

 expressão gênica estatisticamente maior do respectivo gene em uma comparação inter-grupo (DO 0,5 ou 1,0) ($p < 0,05$, Teste ANOVA)

* expressão gênica estatisticamente maior do respectivo gene em uma comparação intra-grupo (DO 0,5 e 1,0) ($p < 0,05$, Teste ANOVA)

** - ausência de expressão

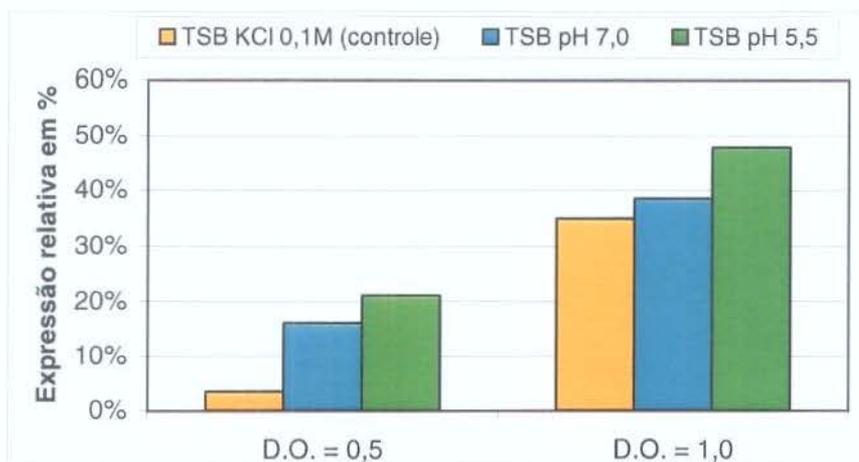


Gráfico 3 . Gráfico da expressão relativa do gene estrutural da mutacina III (*mutAIII*) produzida pela cepa C2S4 em diferentes densidades ópticas e meios de cultura.

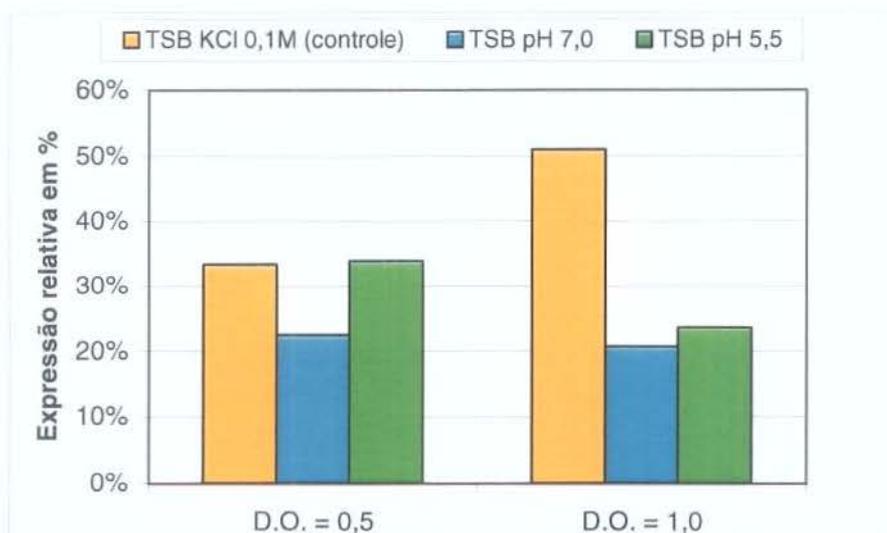


Gráfico 4. Gráfico da expressão relativa do gene estrutural da mutacina III (*mutAIII*) produzida pela cepa C8D10 em diferentes densidades ópticas e meios de cultura.

Mutacina I:

Segundo a análise estatística (ANOVA, $p = 5\%$) a cepa C1S2 apresentou maior produção de mutacina I em meio TSB não tamponado em relação aos meios tamponados em pH 5,5 e pH 7,0, tanto na DO 0.5 como na DO 1.0. Houve maior expressão do gene estrutural *mutAI* (ANOVA $p < 5\%$) em meio TSB não tamponado na densidade óptica = 1.0 (estresse populacional) comparando-se com o nível de expressão em densidade óptica próxima a 0,5.

A cepa C9S9 não apresentou uma expressão significativa do gene *mutAI*, na densidade óptica próxima a 0,5 em nenhum dos meios de cultura utilizados. Houve maior expressão do gene estrutural da mutacina I em meio não tamponado frente ao estresse populacional (DO = 1.0) (Anova, $p < 5\%$).

Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de mutacina I pela cepa C7(5)1 nos diferentes meios de cultura na densidade 1.0. Entretanto, na densidade 0,5 houve maior expressão do gene estrutural da mutacina I nos meios tamponados (pH 5.5 e 7,0) em relação ao controle. Em adição, observou-se maior expressão do gene *mutAI* em meio não tamponado na densidade óptica 1 em relação à 0,5.

Todas as cepas produtoras de mutacina I apresentaram o mesmo perfil de expressão do gene estrutural da mutacina I, sendo mais expresso em meio não tamponado em alta densidade celular, sugerindo uma possível correlação positiva na produção de mutacina I e a densidade populacional (*quorum sensing*), em meios não tamponados, que apresentam variações nos níveis de pH ambiental (Taiete et al., 2008; Taiete et al., 2009a).

TSANG et al. (2006) relata que *S. mutans* possui um elaborado sistema regulatório que controla a expressão da mutacina I; utilizando diversos sistemas como TCSs, PTSs, ou sistemas de sinalização interespécies, ativados

em importantes mudanças ambientais, influenciando na produção de mutacina I. Estudos de Merritt et al. (2005) e de Qi et al. (2004) demonstram que as proteínas codificadas pelos genes *ciaH* e *luxS* é requerido para a produção desse tipo de mutacina. CiaH é uma proteína histidina kinase de um TCSTS (two-component signal-transduction system); enquanto LuxS é responsável pela síntese de uma molécula auto-indutora de sinalização celular interespecies. Esses mesmos produtos regulam outras funções celulares, fundamentais a sobrevivência das espécies de *S. mutans* em nichos de complexidade ambiental como a capacidade de formação de biofilme e a tolerância a condições de estresse. Acredita-se que a síntese de peptídeos antimicrobianos no biofilme dental pode trazer vantagens ecológicas à espécie produtora principalmente neste ambiente altamente competitivo. Os resultados de expressão gênica das mutacinas I e II obtidos no presente estudo corroboram com esta hipótese.

Mutacina II:

Segundo a análise estatística (ANOVA, $p = 5\%$) a cepa C7(5)1 apresentou maior produção de mutacina II em meio TSB não tamponado em relação aos meios tamponados em pH 5,5 e pH 7,0, tanto na DO 0.5 como na DO 1.0 . Foi observada maior síntese de mutacina II (ANOVA $p < 0,05$) frente ao estresse populacional (DO = 1.0) em estresse ácido (pH = 5.5). Este dado enfatiza que a produção da mutacina II pode ser maior em ambientes adversos, como alta densidade populacional e estresse ácido, condições encontradas em biofilme dental. Quando em meio tamponado em pH 7,0, observou-se o contrário, ou seja maior síntese no meio de menor densidade populacional

(ANOVA, $p < 5\%$). Salienta-se que esta mesma cepa também produz a mutacina tipo I, o que pode aumentar seu espectro de atividade antimicrobiana e suas vantagens ecológicas na cavidade bucal.

Já a cepa C18(10)6 apresentou maior expressão do gene *mutAll* nos meios TSB tamponados, principalmente em estresse ácido em $DO = 0,5$. Houve maior expressão do gene estrutural *mutAll* (ANOVA $p < 5\%$) em meio TSB não tamponado na densidade óptica = 1.0 (estresse populacional) comparando-se com o nível de expressão em densidade óptica próxima a 0,5. Já a cepa C7(5)1, também produtora de mutacina II, apresentou maior síntese desta substância sob estresse populacional associado ao estresse ácido. Não se encontrou informações em artigos científicos sobre os possíveis mecanismos de regulação de mutacina II em cepas de *Streptococcus mutans*. Pelos dados expostos, este tipo de mutacina pode apresentar importante vantagem seletiva à cepa produtora, uma vez que ambas as cepas analisadas apresentaram maior expressão do gene estrutural *mutAll* em ambientes de alta densidade populacional/celular, sugerindo um mecanismo de regulação por mecanismos do sistema *quorum-sensing* (Taiete et al., 2008; Taiete et al., 2009a).

Mutacina III:

Dentre as mutacinas caracterizadas, a mutacina tipo III foi a menos estudada quanto aos mecanismos de produção ou regulação gênica. Os meios tamponados apresentaram a melhor condição para a produção de mutacina III pela cepa C2S4, nas diferentes densidades ópticas testadas.

Todos os meios testados apresentaram expressão significativamente maior do gene estrutural da mutacina III sob estresse populacional (DO = 1.0) (gráfico 3). Entretanto a cepa C8D10, produtora de mutacina III, não apresentou o mesmo perfil de expressão gênica. Esta cepa apresentou maior produção de mutacina III em meio tamponado em pH 5,5 e DO = 0,5 (gráfico 4). Não existem estudos que correlacionem a expressão de mutacina III com o sistema *quorum sensing*, o que dificulta a discussão dos dados obtidos no presente estudo. Os resultados contrastantes obtidos acerca da expressão do gene *mutAIII* devem-se ao *background* genético de cada cepa (Taiete et al., 2008; Taiete et al., 2009a).

Em recente trabalho publicado por KAMIYA et al. (2008), cepas produtoras de mutacinas tipo III apresentaram amplo espectro de inibição contra diferentes espécies bacterianas e fúngicas de interesse médico e odontológico, o que reforça o interesse nos estudos sobre a análise da expressão do gene estrutural deste importante fator de virulência de *S. mutans*.

Mutacina IV:

O gene *nImA*, que codifica o peptídeo NImA, um dos componentes da mutacina IV, foi mais expresso em meio de cultura não tamponado em alta densidade celular pela cepa C9S9. Já o gene *nImB* não apresentou o mesmo perfil de expressão, sendo mais expresso em meio TSB tamponado em pH ácido (5,5) e baixa densidade populacional.

O gene *nImA* da mutacina IV foi mais expresso em meio de cultura não tamponado em alta densidade celular pela cepa C1S2, apresentando o mesmo perfil de expressão gênica da cepa C9S9 para o mesmo gene. Já o gene *nImB*

da cepa C1S2 não apresentou o mesmo perfil de expressão do gene *nImA*, sendo mais expresso em meio TSB tamponado em pH ácido (5,5) e baixa densidade populacional.

Houve concordância nos resultados obtidos para a expressão dos genes *nImAB* da mutacina IV para as duas cepas analisadas. Ou seja, ambas apresentaram maior expressão de *nImA* em meio TSB não tamponado e alta densidade celular, e maior expressão de *nImB* em meio ácido e baixa densidade populacional. O que pode indicar que estes genes não estão organizados em um mesmo OPERON discordando com os estudos de Qi et al (2001). Dissecções genéticas do locus *nImAB* não suportam a hipótese de que a mutacina IV seja composta por dois peptídeos de atividades sinérgicas e o papel do peptídeo *NImB* permanece enigmático (Hale et al., 2005). KAMIYA et al. (2008) detectou duas cepas que expressaram positivamente os genes *nImA* ou *nImB* e apresentaram um perfil de espectro antimicrobiano distinto, entretanto o papel individual dos peptídeos *NImA* e *NImB* no espectro de inibição da mutacina IV não pode ser identificado neste estudo.

Van Der Ploeg et al. (2005) relata em seu artigo que a competência para a transformação genética e a formação de biofilme são dependentes do sistema TCSTS ComDE, junto com o peptídeo CSP (peptídeo estimulador de competência) (codificado pelo gene *comC*). Neste estudo van der Ploeg et al. observou que a expressão dos genes *nImA* e *nImB* foram maiores em altas densidades celulares, assim como quando havia um acréscimo do peptídeo CSP, sugerindo que o estresse populacional via sistema TCSTS estimula o desenvolvimento da competência celular assim como a produção da mutacina IV.

Genes regulatórios:

As proteínas kinases CiaH, e ComD são importantes componentes regulatórios que coordenam a expressão dos genes de produção das mutacinas I e IV respectivamente. Interessantemente, estas proteínas também foram correlacionadas com a maior adaptação ao estresse ácido, resistência à bacitracina e desenvolvimento da competência celular. Estudos recentes têm relacionado a produção de peptídeos antimicrobianos com o sistema *quorum-sensing* – TCSTS (Sistema de Transdução de Sinal via Dois Componentes), demonstrando o aumento da expressão de genes estruturais em condições de maior densidade celular ou controle da expressão gênica através de mecanismos regulatórios pertencentes à este sistema [Qi *et al.*, 2004; Hale *et al.*, 2004; van der Ploeg, 2005; Yonezawa & Kuramitsu, 2005].

O Sistema TCSTS é realizado através de dois componentes regulatórios consistindo de uma proteína histidina kinase, associada à membrana citoplasmática, e uma segunda proteína regulatória, situada no citoplasma. A proteína histidina kinase detecta os peptídeos sinais do ambiente (que são sintetizados e exportados para o meio ambiente por um grande número de espécies bacterianas - já que esses sistemas são semelhantes em bactérias gram-positivas – funcionando como um indicador da densidade populacional, pois sua concentração no meio é proporcional ao número de células) e transmite este sinal através da fosforilação da proteína regulatória, ao qual ativa a transcrição de genes alvos envolvidos na adaptação, sobrevivência e mecanismos de virulência [Appleby *et al.*, 1996; Fabret & Hoch, 1999; van der

Ploeg, 2005]. Este sistema funciona como modulador da expressão de diferentes genes em resposta às alterações ambientais.

Outra proteína de membrana relacionada com a síntese de mutacina II é a Dgk. Esta proteína ou enzima cataliza a transferência direta do fosfato presente no MgATP para o glicerol, resultando na formação de ácido fosfatídicos (PA), principal precursor dos fosfolipídeos de membrana (BADOLA & SANDERS, 1997; LIS & KURAMITSU, 2003). O PA gerado através da fosforilação direta do diáglicerol pela Dgk é uma via secundária para a síntese de componentes da membrana. A disruptura do gene *dgk* em *E. coli*, resultou em acúmulo de diáglicerol na membrana, principalmente em baixa osmolaridade (RAETZ & NEWMAN, 1979). Em *E. coli*, o diáglicerol pode ser reciclado pela enzima Dgk para ser reutilizado na síntese de fosfolipídeos. Em bactérias Gram-positivas, o diáglicerol participa da formação de ácido lipoteicóico e fosfolipídeos de membrana (TARON et al., 1983; VIKSTROM et al., 2000). Em estudos prévios, a desruptura deste gene em *S. mutans*, resultou em crescimento reduzido ou alterado em baixo pH, elevadas temperaturas e alta osmolaridade, além de reduzir significativamente a expressão do gene estrutural da mutacina II. Em adição a cepa mutante não produziu mutacina II nos testes fenotípicos, sugerindo que a proteína Dgk regula os níveis de transcrição do *mutAII* e as modificações pós-traducionais do respectivo pré-peptídeo (YAMASHITA et al., 1993; CHEN et al., 1998).

Para a cepa C1S2 a produção do gene estrutural da mutacina I foi maior nos meios não tamponados tanto em D.O 0,5 quanto em D.O 1,0, encontrando maior expressão no meio não tamponado em alta densidade celular. Já a expressão do gene de virulência *ciaH* não apresentou o mesmo padrão do

gene *mutAI*; sendo mais expresso no meio não tamponado em D.O 0,5, enquanto em D.O 1,0 houve maior expressão no meio de cultura tamponado em pH 7,0.

A cepa C9S9 apresentou maior expressão do gene *mutAI* em meio tamponado em pH 7,0 em baixa densidade populacional, enquanto em alta densidade populacional houve maior expressão no meio não tamponado. Sendo que esta última condição foi onde se encontrou a maior expressão de todas as amostras dessa cepa. Após a eletroforese dos produtos da PCR para o gene *ciaH* utilizando o cDNA dessa cepa, não foi encontrado nenhuma banda eletroforética, entretanto o controle positivo (DNA cepa UA 159) e as amostras do gene 16S apareceram normalmente (reação realizada duas vezes); o que sugere falha no anelamento dos *primers* específicos para o gene *ciaH* na reação de PCR, possivelmente pelo fato dessa cepa exibir um polimorfismo genético no locus *ciaH*.

Já a cepa C7(5)1 apresentou maior expressão do gene estrutural da mutacina I na condição de maior densidade populacional em meio não tamponado. Em D.O 1,0 a expressão do gene *ciaH* também foi maior nessa mesma condição. Em D.O 0,5 o gene *ciaH* foi significativamente mais expresso que o gene estrutural da mutacina I.

De uma forma geral o gene estrutural da mutacina I e o gene de virulência *ciaH* foram mais expressos em meio não tamponado (que permite variação no pH ambiental) em alta densidade populacional.

Qi et al. (2004) demonstrou o papel da inativação de cinco genes de proteínas histidinas kinases sobre a produção da mutacina I, e observou que a apenas a inativação do gene *ciaH* resultou na perda completa da produção de

mutacina I pela cepa mutante, o que foi demonstrado pelo método do antagonismo; demonstrou também que a inativação do gene *ciaH* diminuiu o desenvolvimento da competência, tolerância ao estresse e a formação de biofilme dependente de sacarose.

Em alguns casos não houve o mesmo padrão da expressão do gene estrutural da mutacina I e do gene *ciaH*, entretanto segundo Tsang et al., 2005, a produção da mutacina I é controlada por diversos e complexos mecanismos regulatórios. Não se conhece todos os mecanismos envolvidos com a regulação do operon da mutacina I, porém foi previamente demonstrado que o regulador da expressão, *mutR*, e o sensor *ciaH* (TCSTS) são requeridos para a expressão da mutacina I. Outros estudos indicam que além das proteínas codificados pelo gene *ciaH* as proteínas codificadas pelo gene *luxS* são requeridas para a produção da mutacina I. (Merritt et al., 2005; Qi et al., 2004). Merritt et al. (2005) relata em seu estudo que a inativação do gene *luxS* aboliu a síntese desse lantibiótico. Propondo um mecanismo de regulação da expressão da mutacina I mediada por LuxS, que normalmente sintetiza AI-2 (molécula auto-indutora 2), que é secretada para fora da célula; na presença de LuxS funcional a transcrição do gene *irvA* (*irvA* é um gene que quando expresso inibe a síntese da mutacina I) é reprimida. Contudo quando o gene *luxS* é inativado, ou quando a célula encontra estresse ambiental, há um acréscimo da expressão do gene *irvA*. Altos níveis de IrvA leva a repressão da transcrição dos genes *mutA* e *mutR*, o que resulta na falta de expressão da mutacina I.

Esses estudos demonstraram que esses genes são específicos para a mutacina I, já que a sua inativação não alterou a expressão das mutacinas II e mutacina IV.

A expressão do gene estrutural da mutacina II pela cepa C7(5)1 em D.O 0,5 foi maior em meio não tamponado, enquanto o gene *dgK* foi mais expresso em meio tamponado em pH 7,0. Já em D.O 1,0 o gene estrutural foi mais expresso em meio não tamponado enquanto o gene *dgK* foi igualmente expresso. Em todas as condições analisadas a expressão do gene de virulência foi maior que a expressão do gene *mutAll*.

Para a cepa C18(10)6 em D.O 0,5 a expressão do gene estrutural da mutacina II foi maior em meio tamponado em pH 7,0, enquanto o gene *dgK* nessa densidade populacional foi mais expresso (e de maneira semelhante) nos meios controle e tamponado em pH 5,5. Em alta densidade populacional tanto a expressão do gene estrutural quanto do gene regulatório foi maior no meio não tamponado; adicionalmente pode-se observar que o gene *dgK* também foi altamente expresso em meio tamponado em pH neutro.

Esses dados mostram que o gene estrutural da mutacina II e o gene de virulência *dgK* são altamente expressos em ambiente de alta densidade populacional, principalmente em meio não tamponado, havendo diferenças no padrão de expressão desses genes.

A mutacina II é um pequeno peptídeo termoestável que exibe atividade inibitória por inibir o metabolismo das células sensíveis. Os genes de biossíntese dessa mutacina está organizada em um cluster de 7 genes, dentre eles o gene *mutR* que é responsável pela regulação da biossíntese dos genes

do operon; inativação desse gene resulta em mutantes que não expressam o gene *mutAll*.

Chen et al. (1999) relata que a inserção de apenas dois genes, *mutAll* gene estrutural da mutacina II, e *mutM*, gene de modificação, em uma cepa não produtora desse tipo de lantibiótico não foi suficiente para a produção da mutacina II. Concluindo que todos os genes encontrados no operon são necessários para a produção da mutacina II. Além de outros genes regulatórios como o gene *dgK*.

Chen et al. (1998) sugere que a proteína DGK pode desempenhar um importante papel não apenas na adaptação a condições de estresse ambiental, como também na produção de mutacina II. O gene *dgK* desempenha funções na resposta a vários estresse ambientais (pH, temperatura e pressão-osmótica). Nesse estudo para investigar o efeito da inativação do gene *dgK* na expressão do gene estrutural *mutAll*, foi construído uma cepa mutante, defectiva para o gene *dgK*. A cepa mutante e a cepa padrão foram crescidas em meio TSB enriquecido com extrato de levedura, e foram realizadas extrações de RNA em vários pontos da curva de crescimento. RT-PCR foi empregado para analisar a expressão do gene estrutural da mutacina II na cepa mutante e na cepa padrão, encontrando que o nível de transcrição na cepa mutante foi significativamente reduzido em comparação com a cepa padrão. Foi realizado também o teste de antagonismo, e este indicou que não houve produção da mutacina II pela cepa mutante, mesmo que o gene *mutAll* fosse transcrito em um nível baixo. Esta observação conduziu os autores a supor que DgK pode estar envolvido com a regulação da produção da mutacina

II em diversos níveis: no nível de transcrição do gene *mutA*, e também na regulação da tradução e de modificações pós-traducionais.

Mais estudos são necessários para investigar o papel de outros genes regulatórios na expressão desse peptídeo antimicrobiano (Taiete et al., 2009a).

O peptídeo NlmA foi mais expresso em meio de cultura não tamponado em D.O 1,0 pela cepa C1S2, enquanto o peptídeo NlmB foi mais expresso na D.O 1,0 em meio não tamponado e em D.O 0,5 no meio tamponado em pH 5,5. Para esta cepa o gene *comD* foi mais expresso meio não tamponado tanto na D.O 0,5 quanto na D.O 1,0

A cepa C9S9 apresentou em D.O 0,5 maior expressão do gene *nlmA* nos meios não tamponado e tamponado em pH 7,0, ao passo que os genes *nlmB* e *comD* foram mais expressos em meio tamponado em pH 5,5. Na D.O 1,0 os genes *nlmA* e *nlmB* foram mais expressos em meio de cultura não tamponado enquanto o gene *comD* foi mais expresso em meio tamponado em pH 7,0.

A mutacina IV é composta por dois peptídeos (NlmA e NlmB), de pequeno tamanho, que não sofrem modificações pós-traducionais e que são termoestáveis. Age possivelmente pela sua inserção na membrana de outros microrganismos, causando a formação de poros que alteram o potencial de membrana.

Em *S. mutans* a competência para a transformação genética e a formação de biofilme são dependentes do sistema TCSTS ComDE junto com o peptídeo ferormônio CSP (peptídeo estimulador da competência – codificado pelo *comC*). O mesmo sistema é requerido para a expressão dos genes *nlmA* e *nlmB*. Segundo van der Ploeg (2005) o aumento da densidade celular ou a

adição de CSP resultou em acréscimo da expressão dos genes que codificam os peptídeos constituintes da mutacina IV; entretanto quando os genes do sistema *comDE* foram inativados a expressão dos genes *nImA* e *nImB* foi abolida.

No sistema *comDE*, o gene *comC* codifica o precursor do peptídeo ferormônio estimulador da competência (CSP) e *comD* e *comE* que codificam o sensor histidina kinase e a proteína regulatória, respectivamente. Em seu estudo, van der Ploeg relata que a expressão dos genes da mutacina IV é induzida pela adição de CSP, e que a inativação do sistema regulatório *comDE* resulta na ausência de expressão dos genes estruturais da mutacina IV. Para tanto ele observou que adicionando o peptídeo estimulador da competência em diferentes concentração, encontrou que a expressão dos genes *nImA* e *nImB* são dependentes da quantidade de CSP. Relatando que os três componentes do sistema (o peptídeo ferormônio, o sensor histidina kinase e a proteína regulatória) são necessários para a expressão de *nImAB*.

Van der Ploeg nesse mesmo artigo cita que quando mutações no gene *vicK* foram introduzidas, o nível de expressão dos genes *nImA* e *nImB* foi maior que o nível de expressão da cepa padrão, indicando que *vicK* age negativamente na expressão dos genes que codificam os peptídeos da mutacina IV.

Existem diversos genes reguladores da virulência da espécie *S. mutans*, e nem todos foram analisados quanto a influência que exercem na expressão dos genes de biossíntese das mutacinas. Em alguns casos, nesse estudo, o padrão de expressão não foi similar entre os genes regulatórios e o gene estrutural da mutacina; entretanto salienta-se que existe uma grande

diversidade genética entre as espécies de *S. mutans*, o que pode levar a complexos e diversos mecanismos de controle da expressão dos fatores de virulência (Taiete et al., 2009a).

De uma forma geral encontrou-se maior expressão dos genes estruturais das mutacinas e dos genes regulatórios no meio não tamponado, que permite uma variação do pH do meio (dado que concorda com resultados descritos no item 5.1, quando foi encontrado por métodos fenotípicos maior produção de mutacinas em meio não tamponado) em alta densidade celular, o que concorda com resultados encontrados na literatura que estabelecem claramente uma regulação da expressão das mutacinas com o sistema *quorum sensing*.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que outros mecanismos *quorum-sensing* ou proteínas kinases podem estar também relacionados com a produção dessas bacteriocinas.

5.3. Detecção da atividade antimicrobiana de mutacina(s) *in vitro*

A mutacिनotipagem foi realizada para traçar o perfil de sensibilidade de duas cepas indicadoras às mutacinas produzidas pelas cepas produtoras utilizadas nessa metodologia. O perfil de sensibilidade foi determinado de acordo com o tamanho do diâmetro de inibição (em milímetros), seguindo a fórmula: $[(\text{diâmetro da zona de inibição} - 6 \text{ mm}) : (\text{maior diâmetro da zona de inibição obtido} - 6 \text{ mm})] \times 100\%$ (WU et al., 2004).

A cepa *Streptococcus sanguinis* ATCC 15300 foi selecionada como a cepa indicadora, pois apresentou maior sensibilidade a ação das mutacinas

produzidas pelas 6 cepas produtoras empregadas do que a outra cepa indicadora, *S. sanguinis* M5.

Tabela 6. Resultados em unidades arbitrária da concentração inibitória mínima (CIM) e da atividade do extrato (crescimento estatisticamente menor que o controle) da cepa *S. sanguinis* ATCC 15300 submetida a ação dos diferentes extratos brutos.

Cepa	pH do meio	CIM	Atividade
C7(5)1	pH 7.0	1/2	1/2
	pH 5.5*	1/8	1/8
C9S9	pH 7.0	1	1
	pH 5.5	1	1
C1S2	pH 7.0	-	1/8
	pH 5.5*	1	1/16
C18(10)6	pH 7.0	1/2	1/4
	pH 5.5*	1/2	1/8
C8D10	pH 7.0*	-	1
	pH 5.5	-	-
C2S4	pH 7.0	-	-
	pH 5.5	-	-

* Condição de pH em que houve maior atividade antimicrobiana dos extratos brutos contendo as mutacinas

As mutacinas I e II contidas no extrato bruto isolado da cepa C7(5)1 apresentaram maior atividade inibitória em pH 5.5. Em TSB pH 5.5 houve inibição de 100% do crescimento da cepa indicadora até a diluição 1/8 do

extrato, enquanto em TSB pH 7.0 houve inibição de 100% até a diluição 1/2. Neste caso, as diluições que apresentaram diferença significativa em relação ao controle foram as diluições que inibiram totalmente o crescimento da cepa indicadora.

As mutacinas I e IV contidas no extrato bruto da cepa C9S9 apresentaram atividade inibitória iguais em pH 7.0 e em pH 5.5. Houve inibição de 100% no crescimento da cepa indicadora na diluição 1 das duas condições de pH.

As mutacinas I e IV expressas pela cepa C1S2 não apresentaram inibição de 100% do crescimento da cepa indicadora *S. sanguinis* ATCC 15300 em pH 7,0, enquanto em pH 5,5 houve inibição de 100% do crescimento da cepa indicadora na diluição 1, o que pode sugerir maior atividade antimicrobiana dessas mutacinas em pHs mais baixos. Em adição, em pH 7.0, houve diferença estatística até a diluição 1/8 em relação ao crescimento do controle. Já em pH 5.5 houve diferença até a diluição 1/16 ($p < 5\%$ teste t de Student). O que pode sugerir que em pH 5.5 o extrato obtido da cepa C1S2 teve maior atividade antimicrobiana.

Os diferentes resultados de atividade dos extratos das cepas C9S9 e C1S2 podem sugerir que as quantidades das mutacinas I e IV obtidas em cada extrato foram distintas (Taiete et al., 2009a e b). A utilização de extratos brutos nos testes de atividade não gera resultados conclusivos, uma vez que mais de uma substância inibitória pode estar presente nestes extratos, além disso, tais substâncias podem apresentar atividade sinérgica, como é o caso das mutacinas tipo IV e Smb, composta por dois peptídeos

antimicrobianos NlmA e NlmB e SmbA e SmbB, respectivamente (Qi et al., 2001; YONEZAWA H et al., 2005).

A mutacina II isolada da cepa C18(10)6 apresentou inibição de 100% do crescimento da cepa indicadora até a diluição 1/2 tanto em pH 7,0 quanto em pH 5,5. Entretanto pela análise estatística (teste t de Student) pode-se observar que em pH 7.0 houve diferença significativa em relação ao controle até a diluição 1/4, enquanto que em pH 5.5 houve até a diluição 1/8. O que de certa forma pode sugerir que a atividade inibitória da mutacina II obtida da cepa C18(10)6 foi maior em pH ácido.

A mutacina III isolada da cepa C8D10 não apresentou atividade inibitória do crescimento da cepa indicadora *S. sanguinis* ATCC 15300 satisfatória; nos dois pHs não houve inibição de 100% em nenhuma diluição avaliada. Entretanto em pH 7,0 observa-se que na diluição 1, houve inibição de cerca de 50% do crescimento em relação ao controle.

O mesmo ocorreu com a mutacina III isolada da cepa C2S4, que não apresentou atividade inibitória do crescimento da cepa indicadora *S. sanguinis* ATCC 15300 satisfatória; nos dois pHs não houve inibição de 100% em nenhuma diluição avaliada. Esses resultados podem sugerir que a mutacina III está sendo degradada pelo método de precipitação e extração padronizado para as cepas produtoras de mutacinas utilizada nesse estudo, ou então que a concentração desse peptídeo antimicrobiano no extrato bruto obtido é baixa, pelo fato desse tipo de mutacina não ser bem expresso em meios líquidos (Qi et al., 1999; Taiete et al., 2009a e b).

Em resumo, a maioria dos extratos obtidos das cepas produtoras de mutacinas I, II e IV analisadas apresentou maior atividade inibitória em pH

5,5. Já para mutacina tipo III as atividades inibitórias detectadas em diferentes pHs, na microtécnica, foram insuficientes para concluir qual o melhor pH para a atividade deste tipo de mutacina (Taiete et al., 2009a e b).

As atividades das mutacinas também foram analisadas quanto a capacidade de difusão dos antimicrobianos em meios tamponados em pH 7.0 e 5.5. As mutacinas I e II presentes no extrato bruto obtido após a precipitação de proteínas com sulfato de amônia (EBSA) do sobrenadante de cultura da cepa C7(5)1 teve maior capacidade de difusão no meio TSA pH 5.5. No meio TSA pH 7.0 o extrato apresentou atividade inibitória do crescimento da cepa indicadora *S. sanguinis* ATCC 15300 até a diluição 1/32, enquanto em pH 5.5 foi apresentado atividade inibitória até a diluição 1/128. Em adição pode-se observar que as médias dos diâmetros dos halos inibitórios foram maiores no meio TSA pH 5.5 se comparado com as diluições correspondentes no meio TSA pH 7.0 (tabela 7)

A mutacina II contida no extrato bruto e isolada da cepa C18(10)6 apresentou maior capacidade de difusão em TSA pH 5.5. Neste meio a atividade inibitória foi observada até a diluição 1/64, e no meio TSA pH 7.0 até a diluição 1/32. Novamente os halos de inibição foram maiores no meio com pH ácido.

A mutacina tipo III contida no extrato bruto, isolada das cepas C8D10 e C2S4, apresentou maior difusão em TSA pH 5.5. O extrato isolado da cepa C8D10 inibiu o crescimento da cepa indicadora *S. sanguinis* ATCC 15300 apenas na diluição 1, enquanto em pH 5.5 inibiu até a diluição 1/2. Já o extrato bruto da cepa C2S4 não apresentou atividade inibitória contra a cepa indicadora em pH 7.0, e em pH 5.5 apenas na diluição 1. Esses dados

podem sugerir que a mutacina III, que possui um amplo espectro inibitório – demonstrado pela mutacinotipagem –, não é bem produzida em meios líquidos resultando numa concentração baixa desse peptídeo antimicrobiano no extrato bruto, ou que o método padronizado de precipitação e extração de proteínas pode estar degradando esse tipo de mutacina, o que poderia explicar a baixa atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos brutos que contém a mutacina III. A análise da expressão gênica das mutacinas, demonstrou que a expressão do gene estrutural da mutacina III foi semelhante muitas vezes com a expressão dos outros genes estruturais analisados, corroborando com a hipótese de que o método de extração empregado não está sendo adequado para a extração desse tipo de mutacina.

Os extratos brutos isolados das cepas C9S9 e C1S2, produtores das mutacinas I e IV teve maior capacidade de difusão em TSB pH 5.5. O extrato da cepa C9S9 apresentou atividade inibitória até a diluição de 1/32 em pH 7.0 e até a diluição 1/16 em pH 5.5; entretanto os diâmetros dos halos inibitórios em TSA pH 5.5 foram maiores que os diâmetros dos halos apresentados no meio TSA pH 7.0. Enquanto o da cepa C1S2 apresentou atividade inibitória até a diluição 1/8 em pH 7,0 e 1/32 em pH 5,5.

Pode-se observar que todas as mutacinas presentes nos extratos brutos avaliados nesse estudo tiveram maior capacidade de difusão sobre o agar em pH 5.5 (Taiete et al., 2009a e b)

Tabela 7. Resultados do teste de difusão dos extratos brutos em diferentes pHs (média dos diâmetros de inibição em mm):

EBSA/Cepa	Diluição seriada dos extratos e diâmetros dos halos de inibição em diferentes pHs							
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Meio TSA pH 7.0								
C7(5)1 (I e II)	17,5	16	12	8,5	9	6	-	-
C18(10)6 (II)	17,5	15	13	11	6,5	4	-	-
C1S2 (I e IV)	14	11,5	6	4	-	-	-	-
C8D10 (III)	4	-	-	-	-	-	-	-
C2S4 (III)	-	-	-	-	-	-	-	-
C9S9 (I e IV)	14	13	11	5	4	4	-	-
Meio TSA pH 5.5								
C7(5)1 (I e II)	22	17	15	18	15	13	10	4
C18(10)6 (II)	23	21,5	19,5	17,5	15,5	10,5	6	-
C1S2 (I e IV)	20	18	15	12	11	5	-	-
C8D10 (III)	6	4	-	-	-	-	-	-
C2S4 (III)	5	-	-	-	-	-	-	-
C9S9 (I e IV)	19	16	14,5	11	4,5	-	-	-

- ausência de halo inibitório

5.4. Detecção da atividade antimicrobiana de mutacina(s) *in vitro*

- o papel das proteases

Para verificar se a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos era de fato pela ação das mutacinas (proteínas), ou pela ação de substâncias do metabolismo bacteriano de origem não protéica ou mesmo

pela ação deletéria de algum composto utilizado na sua extração, realizou-se o tratamento dos extratos com proteinase K.

A tabela 8 mostra que não houve formação de halos inibitórios nas amostras submetidas a ação da proteinase K, enquanto houve a formação de halos inibitórios nos controles do extrato bruto (EBSA). Demonstrando-se assim que a atividade antimicrobiana apresentada pelos extratos é devido as mutacinas ou às substâncias semelhantes a elas.

Para verificar o papel das proteases salivares sobre as mutacinas contidas nos extratos realizou-se a metodologia anteriormente descrita, entretanto sendo utilizado saliva ao invés da proteinase K. Adicionou-se a mesma quantidade de extrato bruto obtido após precipitação com sulfato de amônia – EBSA e de saliva, sendo então incubadas por 37°C por 2 horas. Pode-se observar que nas amostras controles houve a presença de halos inibitórios até a diluição 1/4 do EBSA. Nas amostras submetidas à ação das proteases salivares verificou-se ainda a presença de halos inibitórios para alguns extratos (veja tabela 9); entretanto em diluições menores e com diâmetro menor de inibição, enquanto para outros extratos não foi observado halos resultantes da inibição do crescimento da cepa indicadora. Indicando que possivelmente as proteases salivares degradam as mutacinas.

A partir desses resultados foi decidido utilizar a mesma metodologia utilizando dessa vez o pellet de proteínas (mutacinas - obtidos com a extração com igual volume de clorofórmio e de extrato com sulfato de amônia - EBCL) ressuspendido em saliva e não mais o extrato bruto diluído. Prosseguiu-se os testes com a mesma metodologia anteriormente descrita.

Dessa vez, as amostras submetidas a ação das proteases contidas na saliva não apresentaram capacidade inibitória (vide tabela 10), enquanto as amostras controles apresentaram atividade inibitória, indicando que as proteases salivares podem degradar as mutacinas, e que essa degradação é dependente da concentração das proteases (Taiete et al., 2009a e b).

O fato das proteases salivares poderem degradar as mutacinas *in vitro* não indicada que *in vivo* ocorra o mesmo, já que pelas características peculiares presentes no biofilme as mutacinas podem encontrar um ambiente de proteção ou barreira física frente as influências do ambiente externo, como por exemplo, a ação da saliva (Taiete et al., 2009a e b).

Tabela 8. Médias dos diâmetros dos halos inibitórios (em mm) obtidos, após diluição seriada do EBSA e tratamento com proteinase K e seus respectivos controles:

Extrato/Tratamento	Diluição dos extratos				
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/32
EBSA/Proteinase K (2h/37°C)					
C7(5)1	-	-	-	-	-
C18(10)6	-	-	-	-	-
C1S2	-	-	-	-	-

C8D10	-	-	-	-	-
C2S4	-	-	-	-	-
C9S9	-	-	-	-	-
EBSA/Proteinase K (CONTROLE)					
C7(5)1	16	14	9	4	-
C18(10)6	13	11	10	-	-
C1S2	10	8	-	-	-
C8D10	4	-	-	-	-
C2S4	5	4	-	-	-
C9S9	11	9	4	-	-

Legenda: - ausência de halo inibitório

Tabela 9. Diâmetros dos halos inibitórios (em mm) obtidos, após diluição seriada do EBSA e tratamento com saliva diluída e seus respectivos controles:

Extrato/Tratamento	Diluição dos extratos				
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/32
EBSA/Saliva diluída (2h/37°C)					
C7(5)1	13	8,5	6,5	-	-
C18(10)6	4	-	-	-	-
C1S2	5	-	-	-	-
C8D10	-	-	-	-	-
C2S4	-	-	-	-	-

C9S9	9	8	4	-	-
EBSA/saliva diluída (CONTROLE)					
C7(5)1	14	10	7	-	-
C18(10)6	11	4	-	-	-
C1S2	11	6	-	-	-
C8D10	4	-	-	-	-
C2S4	4	4	-	-	-
C9S9	10	9	4	-	-

Legenda: - ausência de halo inibitório

Tabela 10. Médias dos diâmetros dos halos inibitórios (em mm) obtidos, após diluição seriada do EBCL e tratamento com saliva e seus respectivos controles:

Extrato/Tratamento	Diluição dos extratos				
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/32
EBSA/saliva (2h/37°C)					
C7(5)1	-	-	-	-	-
C18(10)6	-	-	-	-	-
C1S2	-	-	-	-	-
C8D10	-	-	-	-	-
C2S4	-	-	-	-	-
C9S9	-	-	-	-	-
EBSA/saliva (CONTROLE)					
C7(5)1	15	9	8	-	-

C18(10)6	10	4	-	-	-
C1S2	10	7	-	-	-
C8D10	4	-	-	-	-
C2S4	5	4	-	-	-
C9S9	11	8	4	-	-

Legenda: - ausência de halo inibitório

5.5 Atividade antimicrobiana no desenvolvimento do biofilme bacteriano *in vitro*

Tabela 11. Resultados em unidades arbitrárias. Atividade antimicrobiana dos diferentes extratos na formação de biofilme de *S. sanguinis* e *S. mutans*

Cepa produtora	pH do meio	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>
C7(5)1	pH 7.0	1/32	1/16
	pH 5.5	1/32	1/32
C9S9	pH 7.0	-	1/16
	pH 5.5	-	1/32
C1S2	pH 7.0	1/16	1/16

	pH 5.5	-	1/16
C18(10)6	pH 7.0	1/32	1/16
	pH 5.5	1/16	1/32
C8D10	pH 7.0	1/64	-
	pH 5.5	1/32	-
C2S4	pH 7.0	1/32	1/8
	pH 5.5	1/8	-

Condição de pH em que o extrato bruto obteve maior atividade inibitória da formação de biofilme das espécies indicadoras.

A atividade inibitória da formação de biofilme do extrato bruto, apenas foi considerada quando o crescimento planctônico de determinada diluição tratada com o extrato bruto foi semelhante estatisticamente ao crescimento planctônico do controle. Já que um crescimento planctônico menor leva proporcionalmente a uma formação menor de biofilme; entretanto quando o crescimento planctônico de uma dada diluição tratada com o extrato bruto se assemelha ao crescimento planctônico do controle, e a formação de biofilme é menor do que a formação de biofilme do controle significa que o extrato bruto tem atividade biológica sobre a formação de biofilme das espécies indicadoras.

O extrato bruto da cepa C7(5)1, produtora das mutacinas I e II, inibiu a formação do biofilme de *S. sanguinis* na diluição 1/32, tanto em pH 7,0 como em pH 5,5 nestas diluições não houve diferença estatisticamente significativa dos crescimentos planctônicos em relação aos respectivos controles ($p > 5\%$, teste T). Já para a cepa *S. mutans* UA 130 o extrato bruto da cepa C7(5)1, afetou a formação do biofilme até a diluição 1/16 e 1/32, em pH 7.0 e 5.5,

respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa nos crescimentos planctônicos nestas diluições, em relação ao controle.

O extrato bruto da cepa C1S2, produtora das mutacinas I e IV, inibiu a formação do biofilme de *S. sanguinis* na diluição 1/16, em pH 7,0 nesta diluição não houve diferença estatisticamente significativa do crescimento planctônico em relação ao respectivo controle ($p > 5\%$, teste T). Já em pH 5,5 não houve inibição da formação de biofilme, pois este apenas foi menor que o controle quando o crescimento planctônico também foi menor. Enquanto que o extrato bruto da cepa C1S2 inibiu a formação de biofilme de *S. mutans* na diluição 1/16 tanto em pH 7,0, quanto em pH 5,5. Não houve diferença do crescimento planctônico nessa diluição em relação ao controle ($p > 5\%$, teste t).

O extrato da cepa C9S9, que contém as mutacinas I e IV, não inibiu a formação de biofilme de *S. sanguinis*, já que a formação de biofilme só foi menor que o controle quando o crescimento planctônico também foi menor, o que pode indicar que esses dois tipos de mutacinas não tem atividade biológica na formação de biofilme de *S. sanguinis*, em pH 7,0 ou 5,5. Para a cepa *S. mutans* UA 130 o extrato bruto da cepa C9S9, afetou a formação do biofilme até a diluição 1/16 e 1/32, em pH 7.0 e 5.5, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa nos crescimentos planctônicos nestas diluições, em relação ao controle.

Houve redução na formação de biofilme das células de *S. sanguinis*, submetidas à ação do extrato bruto da cepa C18(10)6, ($p < 0.05$) até as diluições 1/32 e 1/16, nas condições de pH neutro e pH 5,5, respectivamente. Os resultados sugerem que a mutacina tipo II apresenta maior atividade inibitória na formação do biofilme de *S. sanguinis* em condições de pH mais

neutro. O extrato bruto da cepa C18(10)6, produtora da mutacina II, inibiu a formação de biofilme de *S. mutans* na diluição 1/16, em pH 7,0, nesta diluição não houve diferença estatisticamente significativa do crescimento planctônico em relação ao respectivo controle ($p > 5\%$, teste T). Em pH 5,5 a formação de biofilme foi inibido nas diluições 1/16 e 1/32, nessas diluições não houve diferença entre os crescimentos planctônicos em relação ao controle.

O extrato da cepa C2S4, produtora da mutacina tipo III, em pHs 7.0 e 5,5, inibiu a formação de biofilme até as diluições 1/32 e 1/8, respectivamente, em relação ao controle. Nestas diluições não foram encontradas diferenças no crescimento planctônico em relação aos respectivos controles. Os dados sugerem que a mutacina tipo III inibiu a formação de biofilme de *S. sanguinis* de maneira mais acentuada em pH 7.0. O extrato da cepa C2S4, produtora da mutacina tipo III, em pH 7.0, inibiu a formação de biofilme de *S. mutans* até a diluição 1/8, em relação ao controle. Nessa diluição não foi encontrado diferença no crescimento planctônico em relação ao controle. Em pH 5,5 não houve inibição, pois a formação de biofilme só foi menor que o controle quando o crescimento planctônico também foi menor. Os dados sugerem que a mutacina tipo III exerce uma maior atividade inibitória sobre a formação de biofilme de *S. mutans* em pH 7.0.

Nas duas condições de pH testadas o extrato bruto da cepa C8D10, produtora da mutacina III, não apresentou atividade inibitória sobre células planctônicas em todas as diluições testadas. Entretanto a formação de biofilme foi menor ($p < 0.05$) em relação ao controle na diluição 1/64 em pH 7.0 e na diluição 1/32 no pH 5.5. Sugerindo maior atividade contra a formação de biofilme de *S. sanguinis* em pH 7.0. O extrato bruto da cepa C8D10, produtora

da mutacina III, não inibiu a formação de biofilme de *S. mutans* UA 130 em nenhuma condição.

Em resumo, a atividade das mutacinas sobre a formação de biofilme foi dependente da espécie utilizada como cepa indicadora. Em geral a atividade inibitória das mutacinas caracterizadas sobre a formação de biofilme das espécies *S. sanguinis* e *S. mutans* foi maior em pH 7.0 e 5.5, respectivamente. Os resultados sugerem que o pH ambiental pode influenciar na atividade das mutacinas e/ou na sensibilidade da cepa indicadora às substâncias inibitórias (Taiete et al., 2009a e b). Ressalta-se, que o mesmo fator não interferiu no crescimento destas cepas nos diferentes meios utilizados.

Esses resultados podem indicar que num ambiente competitivo e mais ácido, como o biofilme dental, seria de fundamental importância que estas substâncias inibitórias apresentassem maior atividade sobre espécies acidúricas, como *S. mutans*, que naturalmente representam uma maior competitividade ecológica por sobreviverem em condições ambientais como o biofilme dental. Assim, a atividade das mutacinas em baixo pH contribuiria para o processo seletivo de cepas produtoras sobre espécies sensíveis e competidoras naturais (Taiete et al., 2009a e b).

6. Conclusão

- Condições comumente descritas em um biofilme cariogênico, como a depleção de nutrientes e queda de pH interferem na produção e atividade de substâncias semelhantes as mutacinas. A depleção de nutrientes pode restringir a síntese de substâncias semelhantes as mutacinas. A queda de pH influencia positivamente na produção de mutacinas (GUERRA & PASTRANA 2003).
- Os resultados sugerem que as mutacinas I a IV são produzidas em ambientes extremos com alta densidade celular e/ou estresse ácido, caracterizando um fator de virulência, controlado por mecanismos do sistema quorum sensing e importante para a competição ecológica da espécie, principalmente em biofilme dental.

- A variação de pH (queda do pH) leva a uma maior expressão das mutacinas e dos genes regulatórios *ciaH*, *dgK* e *comD*. A produção de mutacinas claramente é regulada pelo sistema *quorum sensing*. A regulação da expressão dos genes estruturais das mutacinas é complexo e outros mecanismos *quorum-sensing* ou proteínas kinases, não avaliadas nesse estudo, podem estar também relacionados com a produção dessas bacteriocinas.
- Condições ambientais comumente descritas em um biofilme cariogênico também influenciam na atividade e difusão das mutacinas.
- As mutacinas podem ser importantes candidatas para futuras aplicações nas áreas médicas e biotecnológicas. As mutacinas representam vantagens ecológicas à cepa produtora.

7. Referências bibliográficas

1. APPLEBY JL, PARKINSON JS, BOURRET RB. Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* 86: 845-848, 1996.
2. BADOLA P, SANDERS CR. *Escherichia coli* diacylglycerol kinase is an evolutionary optimized membrane enzyme and catalyzes direct phosphoryl transfer. *J. Biol. Chem.* 272: 24176-24182, 1997
3. BALAKRISHNAN, M, SIMMONDS, RS., KILIAN, M. and TAGG, JR. Different bacteriocin activities of *Streptococcus mutans* reflect distinct phylogenetic lineages. *J Med Microbiol*, 51: 941-948, 2002.
4. BURNE RA, CHEN YY & PENDERS JE. Analysis of gene expression in *S. mutans* in biofilm in vitro. *Adv Dent Res* 11: 100-109, 1997.
5. BUSARCEVI M, KOJIC M, DALGALARRONDO M, CHOBERT J-M, HAERTLÉ

- T, TOPISIROVIC L. Purification of bacteriocin LS1 produced by human oral isolate *Lactobacillus salivarius* BGHO1. *Oral Microbiol. Immunol.* 23: 254-258, 2008.
6. CAMARGO RAP, TAIETE T, LIMA BA, HÖFLING JF, KAMIYA RU, GONÇALVES RB . Espectro da atividade antimicrobiana de mutacinas produzidas por *Streptococcus mutans* sobre microrganismos de interesse médico e odontológico. In: XIV Jornada Odontológica de Piracicaba, 2007, Piracicaba. XIV Jornada Odontológica de Piracicaba, 2007. (Apresentação de painel).
 7. CAMARGO RAP, TAIETE T, LIMA BA, HÖFLING JF, KAMIYA RU, GONÇALVES RB. Atividade antimicrobiana de mutacinas produzidas por *Streptococcus mutans* sobre microrganismos de interesse médico e odontológico. In: 25ª Reunião Anual da SBPqO, 2008, Águas de Lindóia. *Brazilian Oral Research*, 2008. v. 22. p. 119-119. (Apresentação de trabalho – painel).
 8. CHEN P, QI F, NOVÁK J, CAUFIELD PW. Diacylglycerol Kinase is involved in regulation of expression of the Lantibiotic mutacin II of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 180: 167-170, 1998.
 9. CHEN P, QI F, NOVAK J, CAUDFIELD PW. The specific genes for lantibiotic mutacin II biosynthesis in *Streptococcus mutans* T8 are clustered and can be transferred en bloc. 65(3) 1356-1360, 1999.
 - 10 COSTERTON JW, LENANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPIN-SCOTT HM. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49 (Review): 711-745, 1995.
 - 11 FABRET C, FEHER VA, HOCH JA. Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world. *J. Bacteriol.* 181: 1975-1983, 1999.
 - 12 FLÓRIO FM, KLEIN MI, PEREIRA AC & GONÇALVES RB. Time of initial acquisition of mutans streptococci by human infants. *The journal of Clinical*

- Pediatric Dent. 28: 303-308, 2004.
- 13 GRÖNROOS L, SAARELA M, MÄTTÖ J, TANNER-SALO U, VUORELA A, ALALUUSUA S. Mutacin production by *Streptococcus mutans* may be promote transmission of bacteria mother to child. Infect. Immun. 66: 2595-2600, 1998.
 - 14 GUERRA NP, PASTRANA L. Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* an *Pediococcus acidilactici*. Letters in Applied Microbiology, 37: 51-55, 2003.
 - 15 HALE JDF, NICOLAS CK, JACK RW, TAGG JR. Identification of *nImTE*, the locus encoding the ABA transport system required for export of nonlantibiotic mutacins in *Streptococcus mutans*. Journal of Bacteriol. 187: 5036-5039.
 - 16 HILLMAN JD, JOHNSON KP, YAPHE BI. Isolation of a *Streptococcus mutans* strain producing a novel bacteriocin. Infect. Immun. 44: 141-144, 1984.
 - 17 IKEDA T, IWANAMI T, HIRASAWA M, WATANABE C, MCGHEE JR, SHIOTA T. Purification and certain properties of a bacteriocin from *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 35: 861-868, 1982.
 - 18 JACOB F, LWOFF A, SIMINOVITCH A, WOLLMAN E. Definition de quelques termes relatifs a la lysogènie. Ann. Inst. Pasteur 84: 222-224, 1953.
 - 19 KAMIYA RU, NAPIMOGA MH, ROSA RT, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Mutacins production in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-affected and caries-free individuals. Oral Microbiol. Immunol. 20: 20-24, 2005a.
 - 20 KAMIYA RU, NAPIMOGA MH, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Frequency of four different mutacin biosynthesis genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol. 54: 599-604, 2005b.
 - 21 KAMIYA RU, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Frequency and expression of mutacin biosynthesis genes in isolates of *Streptococcus mutans* with different mutacin producing phenotypes. J Med Microbiol. 57: 626-635, 2008.
 - 22 KITAMURA K, MASUDA N, KATO K, SOBUE S, HAMADA S. Effect of a bacteriocin-producing strains of *Streptococcus sobrinus* on infection and

- establishment of *Streptococcus mutans* on tooth surfaces in rats. *Oral Microbiol. Immunol.* 4: 65-70, 1989.
- 23 KLEIN MI, FLÓRIO FM, HÖFLING JF, PEREIRA AC & GONÇALVES RB. Transmission, diversity and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes: a longitudinal study in Brazilian nursery children. *J Clin Microbiol.* 42: 4620-4626, 2004.
- 24 KRETH J, MERRITT J, SHI W, QI F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J. Bacteriol.* 187: 7193-7203, 2005.
- 25 LI Y-H, LAU PCY, LEE JH, ELLEN RP, Cvitkovich DG. Natural transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J. Bacteriol.* 183: 897-908, 2001a.
- 26 LI Y-H, HANNA MN, SVENSÄTER G, ELLEN RP, CVITKOVICH DG. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J. Bacteriol.* 183: 6875-6884, 2001b.
- 27 LI Y-H, LAU PCY, TANG N, SVENSÄTER G, ELLEN RP, CVITKOVICH DG. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 184: 6333-6342, 2002.
- 28 LIS M, KURAMITSU HK. The stress-responsive *dgk* gene from *Streptococcus mutans* encodes a putative undercaprenol kinase activity. *Infection and Immunity.* 71(4): 1938-1943, 2003.
- 29 MERRITT J, KRETH J, SHI WENYUAN, QI F. LuxS controls bacteriocin production in *Streptococcus mutans* through a novel regulatory component. *Molecular Microbiology.* 57(4), 960-964. 2005.
- 30 NAPIMOGA MH, KAMIYA RU, KLEIN MI, HÖFLING JF, GONÇALVES RB. Transmission, diversity, and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J. Oral Sci.* 47: 59-64, 2005.
- 31 NAPIMOGA MH, KAMIYA RU, ROSA RT, ROSA EAR, HÖFLING JF,

- MATTOS-GRANER RO & GONÇALVES RB. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. J Med Microbiol 53: 697-703, 2004.
- 32 O'TOOLE GA & KOLTER R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 precedes via multiple convergent signaling pathways a genetic analysis. Mol. Microbiol. 28: 449-461, 1998.
- 33 O'TOOLE GA, GIBBS KA, HAGER PW, PHIBBS JR PV & KOLTER R. The global carbon metabolism regulator Cre is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 182: 425-431, 2000.
- 34 PRATTEN J, WILLS K, BARNETT P, WILSON M. *In vitro* studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of *S. sanguinis* biofilms. J. Applied Microbiol. 84: 1149-1155, 1998.
- 35 RAETZ CR, NEWMAN KF. Neutral lipid accumulation in the membranes of *Escherichia coli* mutants lacking diglyceride kinase. J. Biol. Chem. 253: 3882-3887, 1979.
- 36 RILEY MA, WERTZ JE. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. Biochimie 84: 357-364, 2002.
- 37 QI, F, CHEN P, CAUFIELD PW. Purification of mutacin III from group III *S. mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3880-3887, 1999
- 38 QI, F, P. & CAUDFIELD, P. W. The group I strain *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a non lantibiotic bacteriocin, mutacin IV. Appl Environ Microbiol . 67, 15-21, 2001
- 39 QI F, MERRIT J, LUX R & SHI W. Inactivation of the *ciaH* gene in *S. mutans* diminishes mutacin production and competence development, alters sucrose-dependent biofilm formation, and reduces stress tolerance. Infect Immun 72: 4895-4899, 2004.

- 40 SATO Y, YAMAMOTO Y, KIZAKI K. Cloning and sequence analysis of the gbpC gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 65: 668-675, 1997.
- 41 SMITH DJ, AKITA H, KING WF, TAUBMAN MA. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 62: 2545-2552, 1994.
- 42 TAGG JR, DAJANI AS, WANNAMAKER LW. Bacteriocin of a group B streptococcus: partial purification and characterization. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 7: 764-772, 1976.
- 43 TAIETE T, CAMARGO RAP, HÖFLING JF, KAMIYA RU, GONÇALVES RB . Análise da influência do estresse ácido e nutricional sobre a síntese de substâncias semelhantes às mutacinas produzidas por isolados clínicos de *Streptococcus mutans*. In: XIV Jornada Odontológica de Piracicaba, 2007, Piracicaba. Anais da XIV Jornada Odontológica de Piracicaba, 2007. (Apresentação de trabalho – Painel).
- 44 TAIETE T, CAMARGO RAP, HÖFLING JF, KAMIYA RU, GONÇALVES RB. Análise da influência do estresse ácido e populacional na expressão gênica de mutacinas produzidas por isolados de *S. mutans*. In: XV Jornada Odontológica de Piracicaba, 2008, Piracicaba, SP. Anais da XV Jornada Odontológica de Piracaba, 2008. (Apresentação de trabalho – Oral).
- 45 TAIETE T, CAMARGO RAP, KAMIYA RU, GONÇALVES RB. ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO ESTRESSE ÁCIDO, NUTRICIONAL E POPULACIONAL NA SÍNTESE E ATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS SEMELHANTES ÀS MUTACINAS PRODUZIDAS POR ISOLADOS CLÍNICOS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*. In: XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2009, Campinas, SP. Anais do XVII Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP, 2009a (Apresentação de trabalho – Painel).
- 46 TAIETE T, CAMARGO RAP, GONÇALVES RB, KAMIYA RU. Análise da influência do estresse ácido na atividade antimicrobiana de mutacinas

- produzidas por isolados clínicos de *Streptococcus mutans*. In: XVI Jornada Odontológica de Piracicaba, Piracicaba, SP. Anais da XVI Jornada Odontológica de Piracicaba, 2009b (Apresentação de trabalho – oral).
- 47 TSANG P, MERRITT J, NGUYEN T, SHI W, QI F. Identification of genes associated with mutacin I production in *Streptococcus mutans* using random insertional mutagenesis. *Microbiology*. 151, 3947-3955. 2005.
- 48 TSANG, P, MERRIT J, SHI W, QI F. IrvA-dependent and IrvA-independent pathways for mutacin gene regulation in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett*. 261, 231-234. 2006.
- 49 TARON DJ, CHILDS III WC, NEUHAUS FC. Biosynthesis of D-alanyl-lipoteichoic acid: role of diglyceride kinase in the synthesis of phosphatidylglycerol for chain elongation. *J. Bacteriol*. 154: 1110-1116, 1983.
- 50 van der PLOEG JR. Regulation of bacteriocin production in *S. mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence. *Journal of Bacteriol*. 187: 3980-3989, 2005.
- 51 VIKSTROM S, LI S, WIESLANDER A. The nonbilayer/bilayer lipid balance in membranes. Regulatory enzyme in *Acholeplasma laidlawii* is stimulated by metabolic phosphates, activator phospholipids, and doublestranded DNA. *J. Biol. Chem*. 275: 9296-9302, 2000.
- 52 WESTERGREN G, KRASSE B. Evaluation of a Micromethod for Determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*. Jan. 1978, p. 82-83.
- 53 WHILEY RA, BEIGHTON D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 13: 195-216, 1998.
- 54 WU CW, YIN LJ, JIANG ST. Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricult. and Food Chemist*. 52: 1146-1151, 2004.
- 55 YAMASHITA Y, TAKEHARA T, KURAMITSU HK. Molecular characterization

of a *Streptococcus mutans* mutant altered in environmental stress responses. J. Bacteriol. 175: 6220-6228, 1993.

- 56 YONEZAWA H & KURAMITSU HK. Genetic analysis of a Unique Bacteriocin, Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS-5. J. Bacteriol. 193, 541-548, 2005.

8. Anexos

Anexo 1. Médias obtidas das contagens de UFC/ml (em triplicata) das cepas de *S. mutans* produtoras de mutacinas de amplo espectro, em diferentes meios de cultura e microaerofilia (M) ou anaerobiose(A):

Cepas Produtoras	Meios de Cultura					
	condições	TSA	TSA 1/2	TSA KCl	TSA pH 7.0	TSA pH 5,5
1. M18(2)2	(M)	1,72x10E7	1,86 x 10E7	7,7x10E7	6,0x10E7	6,9x10E7
	(A)	2,74x10E7	3,3 x 10E7	3,38 x 10E7	3,16 x 10E7	5,08 x 10E7
2. M7/4	(M)	4,59 x 10E8	2,94 x 10E8	3,32 x 10E8	1,05 x 10E8	1,12 x 10E8
	(A)	4,63 x 10E8	3,71 X 10E8	4,10 x 10E8	2,29 x 10E8	2,54 x 10E8
3. C18(10)6	(M)	1,80 x 10E7	1,76 x 10E7	1,18x10E8	9,5x10E7	1,2x10E8
	(A)	1,97 x 10E7	2,17 x 10E7	2,54 x 10E7	1,58 x 10E7	3,0 x 10E7
4. C8/P7	(M)	1,24 x 10E9	1,69 x 10E9	1,47 x 10E9	1,4x10E8	9,2x10E6
	(A)	2,51 x 10E9	3,23 x 10E9	3,34 x 10E9	1,55 x 10E9	2,26 x 10E9
5. C8/S12	(M)	6,36x 10E7	5,25 x 10E7	6,29 x 10E7	1,4 x 10E7	2,44 x 10E7
	(A)	3,96 x 10E8	3,2 x 10E8	3,69 x 10E8	5,1 x 10E7	7,23 x 10E8
6. C2P2	(M)	2,55 x 10E9	2,85 x 10E9	3,4 x 10E9	1,77 x 10E9	1,68 x 10E9
	(A)	4,0 x 10E9	4,14 x 10E9	5,37 x 10E9	3,92 x 10E9	3,24 x 10E9
7. C2/S3	(M)	4,62 x 10E8	4,61 x 10E8	2,8x10E7	9,8x10E6	1,6x10E7
	(A)	2,57 x 10E8	2,57 x 10E8	2,88 x 10E7	1,06 x 10E7	2,57 x 10E7
8. C2/S12	(M)	5,70 x 10E7	5,97 x 10E7	1,1x10E7	1,6x10E7	1,33x10E5
	(A)	2,17 x 10E9	2,08 x 10E9	2,8 x 10E8	2,70 x 10E8	1,70 x 10E8
9. C18(4)2	(M)	4,34 x 10E8	4,56 x 10E8	6,13x10E7	2,36x10E7	3,64x10E7
	(A)	2,25 x 10E9	2,66 x 10E9	2,08 x 10E9	2,17 x 10E9	2,4 x 10E9
10. C5/S12	(M)	4,18 x 10E7	1,62 x 10E7	1,61x10E7	1,27x10E7	1,18x10E7
	(A)	3,49 x 10E8	4,72 x 10E8	3,23 x 10E8	4,81 x 10E8	3,13 x 10E8
11. C8/D7	(M)	1,88x 10E8	1,81x 10E8	1,8x10E8	1,1x10E8	1,4x10E8
	(A)	1,82 x 10E9	1,74 x 10E9	1,58 x 10E9	1,29 x 10E9	1,49 x 10E9
12. C8/D10	(M)	4,56 x 10E8	6,22 x 10E8	3,89 x 10E7	3,5x10E7	8,8x10E6
	(A)	4,1 x 10E7	4,26 x 10E7	2,76 x 10E7	2,16 x 10E7	3,48 x 10E7
13. C9/S14	(M)	2,84 x 10E7	8,4 x 10E7	5,86x10E6	2,7x10E6	1,86x10E6
	(A)	3,88 x 10E7	3,72 x 10E7	3,64 x 10E7	1,77 x 10E7	4,02 x 10E7
14. C9/D3	(M)	3,01 x 10E7	2,49 x 10E7	1,3x10E8	4,7x10E7	1,3x10E8
	(A)	2,53 x 10E7	2,97 x 10E7	3,21 x 10E7	2,02 x 10E7	2,68 x 10E7
15. C7(5)1	(M)	3,46 x 10E9	2,82 x 10E9	2,24 x 10E9	5,7x10E8	1,81 x 10E9
	(A)	3,89 x 10E8	4,29 x 10E8	5,22 x 10E7	4,37x10E7	1,98 x 10E7
16. C2/S4	(M)	2,33 x 10E8	2,22 x 10E8	6,46x10E7	2,6x10E7	1,33x10E6
	(A)	4,92 x 10E8	4,92 x 10E8	4,78 x 10E7	1,64 x 10E7	2,10 x 10E7

Anexo 2. Médias obtidas das contagens de UFC/ml (em triplicata) das cepas indicadoras, em diferentes meios de cultura e microaerofilia (M) ou anaerobiose (A):

Cepas Indicadoras	Meios de Cultura					
	condições	TSA	TSA 1/2	TSA KCI	TSA pH 7.0	TSA pH 5,5
1. <i>S. pyogenes</i> ATCC8668	(M)	5,16 x 10E7	4,9 x 10E7	1,74 x 10E7	5,6 x 10E6	4,0X10E5
	(A)	3,56 x 10E7	4,01 x 10E7	1,25X10E7	6,16X10E5	1,1X10E6
2. <i>S. oralis</i> PB 182	(M)	1,62 x 10E8	1,44 x 10E8	4,0X10E6	3,1X10E6	3,65X10E6
	(A)	1,36 x 10E8	1,76 x 10E8	3,1X10E6	3,4X10E6	4,1X10E6
3. <i>S. sanguinis</i> RP66	(M)	1,89 x 10E8	1,90 x 10E8	2,13 x 10E8	1,52 x 10E8	1,6X10E7
	(A)	2,22 x 10E8	1,29 x 10E8	2,01 x 10E7	1,08 x 10E7	1,69 x 10E7
4. <i>S. sanguinis</i> ATCC 15300	(M)	2,8 x 10E8	2,98 x 10E8	1,47 x 10E8	8,4 x 10E7	1,62 x 10E8
	(A)	2,24 x 10E8	3,56 x 10E8	2,24 x 10E8	1,04 x 10E8	2,68 x 10E8
5. <i>S. mutans</i> UA130	(M)	1,02 x 10E8	1,13 x 10E8	1,09 x 10E8	7,46 x 10E7	1,1 x 10E8
	(A)	5,06x 10E7	4,66 x 10E7	4,88 x 10E7	4,92 x 10E7	4,42 x 10E7
6. <i>S. mutans</i> C5(5)6 Isolado 1	(M)	2,12 x 10E8	2,22 x 10E8	4,85X10E7	7,2X10E7	6,9X10E7
	(A)	5,97 x 10E7	5,01 x 10E7	5,9X10E7	7,7X10E7	6,4X10E7
7. <i>S. mutans</i> C18(4)3 Isolado 2	(M)	1,62 x 10E8	1,81 x 10E8	1,65 x 10E8	1,3X10E8	1,36 x 10E8
	(A)	3,34 x 10E7	5,41 x 10E7	5,05 x 10E7	3,46 x 10E7	4,05 x 10E7
8. <i>S. mutans</i> C28(5)8 Isolado 3	(M)	2,89 x 10E7	3,9 x 10E7	3,56 x 10E7	3,72 x 10E7	2,41 x 10E7
	(A)	1,14 x 10E7	1,65 x 10E7	1,10 x 10E7	1,26 x 10E7	1,05 x 10E7

Anexo 3. Médias dos diâmetros de inibição em mm das cepas indicadoras frente às mutacinas produzidas por isolados de *S. mutans* crescidos em TSA normal e TSA diluído 1 x (TSA ½) em microaerofilia (M) e em anaerobiose (A):

Meios de cultura		TSA normal								TSA 1/2							
Cepas Produtoras <i>S. mutans</i> n = 16	Condições	Cepas Indicadoras (n=8)								Cepas Indicadoras (n=8)							
		<i>S. pyogenes</i> ATCC8668	<i>S. oralis</i> PB182	<i>S. sanguinis</i> RP66	<i>S. mutans</i> UA130	<i>S. mutans</i> C5(5)6	<i>S. mutans</i> C18(4)3	<i>S. mutans</i> C28(5)8	<i>S. sanguinis</i> ATCC 15300	<i>S. pyogenes</i> ATCC8668	<i>S. oralis</i> PB182	<i>S. sanguinis</i> RP66	<i>S. mutans</i> UA130	<i>S. mutans</i> C5(5)6	<i>S. mutans</i> C18(4)3	<i>S. mutans</i> C28(5)8	<i>S. sanguinis</i> ATCC 15300
1 M18(2)2	M	18	18	20	12	18	20	10	16	18	20	20	14	9	19	14	17
	A	20	20	14	14	20	20	14	20	17	18	20	9	8	16	13	15
2. M7/4	M	20	12	18	14	14	20	12	12	12	12	16	14	0	19	12	11
	A	20	20	10	18	10	20	16	16	11	7	19	12	6	16	13	10
3. M18(2)16	M	20	14	20	10	17	18	6	14	10	0	8	0	6	0	0	0
	A	20	20	10	12	18	19	10	18	9	15	15	6	4	12	8	5
4. C8/P7	M	20	12	20	18	12	20	16	16	12	8	18	16	5	16	12	12
	A	20	20	18	18	9	20	18	10	7	6	18	10	4	13	9	6
5. C8/S12	M	20	14	20	18	16	20	14	13	14	10	20	14	4	16	14	9
	A	20	16	14	18	13	20	16	16	5	5	17	12	4	16	10	10
6. C2P2	M	20	18	20	18	14	20	14	14	14	10	15	14	4	16	14	10
	A	20	20	18	20	14	20	16	14	5	5	19	13	4	16	10	10
7. C2/S3	M	20	18	20	18	17	20	14	14	12	13	19	14	4	19	14	14
	A	20	20	20	20	10	20	14	8	6	6	20	14	4	17	12	10
8. C2/S12	M	20	12	16	12	7	20	10	11	12	11	14	12	4	16	14	13
	A	20	20	14	20	6	19	14	8	6	7	19	12	4	14	10	9
9. C18(4)2	M	20	12	18	14	9	18	10	8	14	6	14	11	4	13	8	4
	A	20	16	10	16	6	20	10	10	7	3	14	9	4	15	9	9
10. C5/S12	M	20	20	20	10	14	20	10	14	20	18	20	13	9	14	10	18
	A	20	18	14	20	20	20	12	18	16	15	20	10	12	16	10	13
11. C8/D7	M	20	12	20	18	10	20	14	14	16	12	15	13	4	13	12	11
	A	20	16	20	20	8	20	18	12	10	8	20	12	4	17	11	7
12. C8/D10	M	20	12	20	18	6	20	16	13	16	11	16	13	4	13	12	11
	A	20	18	14	20	7	20	10	10	10	8	20	11	4	15	11	6
13. C9/S14	M	20	4	14	14	12	20	14	11	10	9	14	14	4	16	8	8
	A	20	14	14	18	6	20	12	12	8	3	18	11	4	14	11	8
14. C9/D3	M	20	4	20	16	10	20	16	12	8	9	14	12	4	15	6	9
	A	20	6	14	18	7	20	14	12	8	4	18	11	4	15	9	8
15. C7(5)1	M	20	6	10	0	3	0	0	0	10	0	5	0	0	0	0	0
	A	20	14	4	6	5	0	0	4	5	2	11	0	0	0	0	0
16. C2/S4	M	20	8	20	4	7	0	0	12	16	0	16	0	0	0	0	0
	A	20	16	20	20	7	0	0	16	20	5	20	0	0	0	0	0

Anexo 4. Médias dos diâmetros de inibição em mm das cepas indicadoras frente às mutacinas produzidas por isolados de *S. mutans* crescidos em TSA KCl (0,1M) e TSA tamponado em pH 5,5 em microaerofilia (M) e em anaerobiose (A):

Meios de cultura		TSA KCl								TSA pH 5,5							
Cepas Produtoras <i>S. mutans</i> n = 16	Condições	Cepas Indicadoras (n=8)								Cepas Indicadoras (n=8)							
		<i>S. pyogenes</i> ATCC8668	<i>S. oralis</i> PB182	<i>S. sanguinis</i> RP66	<i>S. mutans</i> UA130	<i>S. mutans</i> C5(5)6	<i>S. mutans</i> C18(4)3	<i>S. mutans</i> C28(5)8	<i>S. sanguinis</i> ATCC 15300	<i>S. pyogenes</i> ATCC8668	<i>S. oralis</i> PB182	<i>S. sanguinis</i> RP66	<i>S. mutans</i> UA130	<i>S. mutans</i> C5(5)6	<i>S. mutans</i> C18(4)3	<i>S. mutans</i> C28(5)8	<i>S. sanguinis</i> ATCC 15300
1. M18(2)2	M	19	15	20	11	9	12	7	14	0	11	0	0	5	4	3	8
	A	18	20	18	14	14	12	20	16	0	20	0	14	16	17	10	20
2. M7/4	M	20	4	10	8	6	3	3	7	0	8	0	0	6	4	8	8
	A	20	15	20	20	7	12	19	20	0	18	0	20	7	20	19	20
3. M18(2)16	M	20	4	10	8	6	3	3	7	0	4	0	0	4	6	3	6
	A	20	19	20	12	14	11	14	20	0	20	0	13	12	18	9	20
4. C8/P7	M	20	13	20	13	14	16	12	17	0	14	0	0	6	13	15	15
	A	20	16	20	19	8	13	19	20	0	14	0	18	6	19	18	20
5. C8/S12	M	18	15	20	9	10	16	15	14	0	8	0	0	5	14	9	13
	A	20	13	20	20	8	20	20	20	0	11	0	17	6	17	16	20
6. C2P2	M	20	14	20	9	9	16	15	20	0	7	0	0	6	6	7	14
	A	20	13	20	20	7	19	20	20	0	13	0	18	6	18	17	20
7. C2/S3	M	20	15	20	17	13	20	19	20	0	10	0	0	10	13	12	19
	A	20	13	20	20	7	19	20	20	0	17	0	16	4	19	16	20
8. C2/S12	M	20	4	6	8	5	3	3	7	0	6	0	0	4	6	3	10
	A	19	6	20	10	6	6	11	14	0	14	0	20	6	19	13	20
9. C18(4)2	M	15	4	10	7	5	4	4	6	0	4	0	0	5	4	2	6
	A	20	6	16	6	5	5	8	13	0	10	0	14	4	15	8	20
10. C5/S12	M	20	6	14	8	5	5	5	9	0	13	0	0	6	7	4	11
	A	20	20	20	11	14	7	10	20	0	20	0	14	14	16	9	20
11. C8/D7	M	20	16	20	20	13	20	16	17	0	7	0	0	10	14	11	14
	A	20	17	20	20	8	20	20	20	0	16	0	19	5	18	15	20
12. C8/D10	M	20	14	20	19	13	20	15	20	0	13	0	0	12	16	14	16
	A	20	16	20	20	8	19	20	20	0	16	0	19	4	18	18	20
13. C9/S14	M	20	10	19	11	8	18	13	16	0	8	0	0	10	12	13	15
	A	20	16	20	14	8	20	19	20	0	16	0	20	6	20	16	20
14. C9/D3	M	20	14	20	12	12	20	16	20	0	10	0	0	12	11	6	12
	A	20	19	20	20	9	20	20	20	0	12	0	20	6	19	14	20
15. C7(5)1	M	20	6	10	8	4	4	4	12	0	3	0	0	8	14	4	18
	A	20	9	20	5	4	8	7	20	0	10	0	18	5	15	16	20
16. C2/S4	M	20	9	20	6	6	4	4	7	0	10	0	0	8	16	4	15
	A	20	16	20	7	6	11	7	19	0	17	0	8	4	12	3	20

Obs: Não houve formação de halos inibitórios em TSA tamponado em pH 7,0.



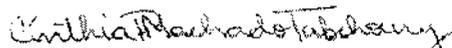
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise da influência do estresse ácido, nutricional e populacional na síntese e atividade de substâncias semelhantes às mutacinas produzidas por isolados clínicos de *Streptococcus mutans*", protocolo nº 002/2008, dos pesquisadores REGINALDO BRUNO GONÇALVES, REGIANNE UMEKO KAMIYA, RODOLFO ALBERTO PIRES DE CAMARGO e TIAGO TAIETE, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 13/02/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Analysis of stress acid, nutritional and population influence in synthesis and activity of similar substances to mutacins produced for clinical isolated of *Streptococcus mutans*", register number 002/2008, of REGINALDO BRUNO GONÇALVES, REGIANNE UMEKO KAMIYA, RODOLFO ALBERTO PIRES DE CAMARGO and TIAGO TAIETE, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 13/02/2008.


Profa. Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

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