



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Eduardo Martinelli Franco

Caracterização de produção de amilóides por
Streptococcus sanguinis
sob diferentes formas de crescimento

Piracicaba

2020

EDUARDO MARTINELLI FRANCO

**Caracterização de produção de amilóides por
Streptococcus sanguinis sob diferentes formas de
crescimento**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-dental, na Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner

Coorientador: Profa. Dra. Livia Araújo Alves

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida pelo aluno Eduardo Martinelli Franco e orientada pela Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos-Graner.

Piracicaba

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

F848c Franco, Eduardo Martinelli, 1990-
Caracterização de produção de amilóides por *Streptococcus sanguinis* sob diferentes formas de crescimento / Eduardo Martinelli Franco. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Renata de Oliveira Mattos Graner.

Coorientador: Livia Araújo Alves.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Streptococcus sanguis*. 2. Biofilmes. 3. Matriz extracelular. 4. Amilóide. 5. Saliva. 6. Polifenóis. I. Mattos-Graner, Renata de Oliveira, 1971-. II. Alves, Livia Araújo, 1988-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of amyloid production by *Streptococcus sanguinis* under different growth forms

Palavras-chave em inglês:

Streptococcus sanguis

Biofilms

Extracellular matrix

Amyloid

Saliva

Polyphenols

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Mestre em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Renata de Oliveira Mattos Graner [Orientador]

Marlise Inêz Klein Furlan

Renato Corrêa Viana Casarin

Data de defesa: 27-11-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5392-0167>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1052673415187514>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 27 de novembro de 2020, considerou o candidato EDUARDO MARTINELLI FRANCO aprovado

PROF^a. DR^a. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

PROF^a. DR^a. MARLISE INÊZ KLEIN FURLAN

PROF. DR. RENATO CORRÊA VIANA CASARIN

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

DEDICATORIA

Dedico este trabalho,

aos meus pais Sanda e Eduardo, por todo apoio que sempre me deram em todos os momentos da minha vida, à minha orientadora Renata de Oliveira Mattos Graner, uma excelente professora, que me deu a oportunidade e realizando esse trabalho, minha coorientadora Livia Alves Araújo, que sempre com muita paciência e dedicação me ajudou desde o primeiro momento no laboratório. Aos meus colegas de trabalho que sempre me ajudaram e me auxiliaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, pelo dom da vida e em sua sabedoria sempre nos guiando e fortalecendo para que possamos tomar as melhores decisões e carregar em nossos corações apenas aquilo que nós fortalecemos.

À minha mãe, Sandra Amelia Gaussmann Martinelli Franco e meu pai Carlos Eduardo Franco da Rocha, que sempre me apoiaram em todos os momentos e me deram forças para continuar, sou grato pois sem vocês nunca chegaria onde estou nesse momento e com o carinho e amor de vocês irei continuar, e agradecer também a minha irmã e família que sempre estamos juntos e nos ajudando mutuamente.

Também dedico muitos agradecimentos aos meus amigos, que sempre estão presentes em minha vida e são uma parte muito importante, quando precisamos de apoio ou carinho e também agradecer a Karoline Teles uma pessoa importante que me apoiou muito para conseguir ingressar no mestrado. Um agradecimento especial a minha grande amiga Rosana Metler por sempre me ajudar e me ouvir. Também um agradecimento à Izabela Rodrigues de Siqueira por todo apoio nessa etapa final do meu mestrado.

Um agradecimento especial à minha orientadora Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner que sem a oportunidade que ela me ofereceu nunca estaria aqui, que conseguiu ver em mim o potencial para esse trabalho e sempre nos apoiando e ajudando presente em nosso dia-a-dia, sou muito grato por todo aprendizado até esse momento e espero continuar expandindo meus conhecimentos todos os dias e também agradecer à todos os professores e funcionários do Departamento, o Prof. Dr. José Francisco Höfling, Prof. Marcelo Boriollo e a Valéria Franco, muito obrigado. E um agradecimento à Dra. Flávia Sammartino Mariano Rodrigues e o Dr. Gustavo Narvaes Guimarães, pelo auxílio no departamento de microscopia da FOP/UNICAMP.

Um agradecimento muito especial aos meus companheiros de laboratório, em especial meus colegas de bancada, o Victor, Hassan, Geovanny e Lívia, que sempre estão ali dispostos a me ajudar e auxiliar sempre, que não são apenas colegas de trabalho, mas também amigos que levamos para a vida inteira. E um agradecimento também aos amigos que cultivamos dentro da universidade, a Amanda, Douglas, Rodolfo e tantos outros que fazem parte do nosso convívio.

Gostaria de agradecer ao pessoal do Laboratório de Controle Hormonal do Desenvolvimento Vegetal, no departamento de Ciências Biológicas da ESALQ/USP, em especial Prof. Dr. Lázaro E. Pereira Peres por ceder um espaço e o equipamento necessário para essa pesquisa e a técnica de laboratório Cássia Regina Fernandes Figueiredo, por nos receber e auxiliar sempre em todos os momentos.

Gostaria de agradecer também o Dr. Mogens Kilian (Institute of Medical Microbiology and Immunology, Aarhus University, Aarhus, Dinamarca) pelas cepas de *S. sanguinis* cedidas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/02054-4.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 148479/2018-9

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP/FOP) pela oportunidade concedida

RESUMO

O gênero bacteriano *Streptococcus* predomina nos estágios iniciais de formação dos biofilmes dentários e inclui *Streptococcus sanguinis*, espécie capaz de iniciar biofilmes através da ligação à película adquirida do esmalte e da síntese de matriz extracelular composta por exopolímeros como polissacarídeos, eDNA e amilóides. A participação de fibras amilóides (FA) na maturação de biofilmes é compatível com a inibição de formação de biofilmes por compostos que interferem na biogênese de FA, como epigallocatequina galato (EGCG). O objetivo deste estudo foi caracterizar a produção de FA por cepas de *S. sanguinis*, e avaliar o papel destes polímeros na formação de biofilmes. Para isto, um total de nove cepas *S. sanguinis* (SK36, SK49, SK72, SK115, SK160, SK330, SK353, SK678 e SK1056) foram cultivadas em meio ágar BHI ou meio quimicamente definido (MQD) e culturas ou extratos proteicos corados com vermelho Congo (VC) e tioflavina T (TT), para análise de microscopia de luz polarizada e microscopia confocal ou espectrofluorimetria, respectivamente. A influência de EGCG na formação de biofilmes também foi analisada em ensaios com placas de 96 poços de culturas com meio BHI ou BHI com 10% de saliva humana (BHIS), suplementados com 1% de sacarose. A formação de FA foi ainda analisada em sobrenadantes de cultura em MQD concentrados e corados com TT. As cepas *S. sanguinis* SK36 e *Streptococcus mutans* UA159 foram utilizadas como referência. FA não foram detectadas em análises de birrefringência de colônias, mas sim em biofilmes de 18 h em todas as cepas *S. sanguinis* e UA159. FA coradas com TT foram detectadas em amostras de sobrenadantes de todas as cepas estudadas, mas diferenças significativas nas quantidades de FA foram observadas entre as cepas (Mann Whitney; $p < 0,05$). EGCG (1mM; 0,482 mg/mL) promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) na formação de biofilmes em diversas cepas, embora não tenha afetado a biomassa de biofilmes nas cepas SK36, SK678 e SK1056. Portanto a produção de FA ocorre em biofilmes e em sobrenadantes de cultura planctônica em diversas cepas *S. sanguinis*. EGCG aumenta a formação de biofilmes em algumas cepas, por mecanismos desconhecidos. Este estudo reforça a necessidade de identificação de proteínas secretadas ou de superfície celular de *S. sanguinis* capazes de formar FA. Além disto, os resultados obtidos indicam que a investigação dos mecanismos pelos quais EGCG modula a formação de biofilmes em *S. sanguinis* pode contribuir para a compreensão dos mecanismos de formação de biofilmes por esta espécie bacteriana

Palavras-chave: *Streptococcus sanguinis*. Biofilme. Matriz extracelular. Amilóide. Saliva. DNA extracelular (eDNA). Vermelho Congo (VC). Tioflavina T. Polifenóis.

ABSTRACT

Streptococcal species predominate in the early stages of tooth biofilm formation and include *Streptococcus sanguinis*, a species capable of initiating the development of oral biofilm, through adhesins with affinity to acquired dental pellicle and extracellular matrix synthesis, composed polymeric substances, as polysaccharides, eDNA and amyloids. Amyloid fibers (AF) participation in biofilm maturation is compatible with the biofilm formation inhibition, using compounds that interfere with AF biogenesis, such as epigallocatechin gallate (EGCG). This study aimed to characterize the AF production in *S. sanguinis* strains and evaluate the polymers' function on biofilm formation. To that goal, nine *S. sanguinis* strains (SK36, SK49, SK72, SK115, SK160, SK330, SK353, SK678 and SK1056) was inoculated in BHI agar or chemically defined medium (CDM) and cultures or protein extracts stained with Congo Red (CR) and Thioflavin T (ThT), for polarized light microscopy and confocal fluorescence microscopy. This study aimed to characterize the AF production in *S. sanguinis* strains and evaluate the polymers' function on biofilm formation. The AF formation was analyzed through culture supernatants concentrated in CDM and stained with ThT. *S. sanguinis* strains SK36 and *S. mutans* UA159 were used as reference. AF was not detected in birefringence analysis with colonies, however it was detected in 18 hours of biofilm grown in all *S. sanguinis* strains and UA159. It was detected AF in supernatants samples stained with ThT of all strains, but significant differences quantities was observed between strains (Mann Whitney; $p < 0.05$). EGCG (1mM; 0.482 mg/mL) promoted a significant increase ($p < 0.05$) in biofilms formation in several strains, although it did not affect the biofilms biomass in strains SK36, SK678 and SK1056. AF production on biofilms and planktonic supernatant culture in several *S. sanguinis* strains. The study results indicate the EGCG increases the biofilm formation in some strains, by uncharted mechanism. This study reinforces the necessity to identifying the secreted and surface proteins on *S. sanguinis* able to produce AF. Furthermore, an investigation of the mechanisms by which EGCG modules a biofilm formation in *S. sanguinis* can contribute to the understanding of the biofilm formation mechanisms by this bacterial species.

Keywords: *Streptococcus sanguinis*. Biofilm. Amyloids. Spittle. Extracellular DNA (eDNA). Congo Red (VC). Thioflavin T. Polyphenols. Extracellular matrix.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Análise de birrefringência das células de <i>S. sanguinis</i>	29
Figura 2: Análise de birrefringência em biofilmes maduros de <i>S. sanguinis</i>	30
Figura 3: Microscopia de confocal utilizando o corante Tioflavina T em extratos de sobrenadantes concentrados de cepas de <i>S. sanguinis</i>	31
Figura 4: Análise em fluorímetro da formação de amilóides em amostras de sobrenadante concentradas de <i>S. sanguinis</i>	32
Figura 5: Géis de SDS das amostras de extratos de sobrenadantes das cepas de <i>S. sanguinis</i>	33
Figura 6: Análises de biofilmes maduros de 18 h de <i>S. sanguinis</i> na presença ou não de saliva humana, e na presença ou não de EGCG.....	34

LISTA DETABELAS

Tabela 1: Cepas estudadas na pesquisa.....	23
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ADOTADAS

A550nm - Absorbância no comprimento de onda de 550 nanômetros.

A575nm - Absorbância no comprimento de onda de 575 nanômetros.

ATCC - *American Type Culture Collection*.

BHI - Infusão de cérebro e coração comercial (Brain Heart Infusion).

BHIS - BHI acrescido com 10% de saliva humana.

VC –Vermelho Congo.

et al.- e outros (de et alli).

eDNA : DNA extracelular

EGCG: epigallocatequina galato

GtfP: proteína glicosiltransferase P

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio.

mM: milimolar.

Mor: morin

Myr: miricetina

NaCl: Cloreto de Sódio

NDGA: ácido nordiidroguaiarético

PA - Película Adquirida.

pH - Potencial hidrogênico.

PMSF: fenilmetilsulfonil

Rcf - unidade de força centrífuga relativa (RCF).

spxB : gene que induz a produção de peróxido de hidrogênio.

TT: Tioflavina T

SUMÁRIO

	Página
1- Introdução	15
2-Revisão da literatura	17
3-Proposição	26
4-Material e métodos	27
5-Resultados	33
6-Discussão	39
7-Conclusão	45
Referências	46
Anexos	58
Anexo 1- Parecer do Comitê de ética em pesquisa	58
Anexo 2- Relatório de similaridade	59

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral apresenta centenas de microrganismos, que se apresentam em sua forma planctônica ou em biofilmes, a grande maioria sendo comensais (Berger *et al.*, 2018) e outras relacionadas a doenças bucais, como por exemplo a cárie e a periodontite (Aas *et al.*, 2005). O grupo dos *Streptococcus* representa cerca de 80% dos microrganismos presentes na fase inicial dos biofilmes dentários nas primeiras 4 e 8 horas (Diaz *et al.*, 2006). Dentro desse grupo, a espécie *Streptococcus sanguinis* destaca-se como colonizador pioneiro das superfícies dentárias por aderir aos componentes da película adquirida e iniciar a formação dos biofilmes dentários (Moraes *et al.*, 2014).

Os biofilmes são comunidades de células microbianas que crescem aderidas a superfícies (Nadell *et al.*, 2009). Além das células, os biofilmes apresentam uma matriz de polímeros extracelulares (PEC) que fazem parte do arcabouço estrutural (Donlan & Costerton, 2002). Outro componente importante da matriz extracelular dos biofilmes são as fibras amilóides (Larsen *et al.*, 2007), constituídas por polipeptídeos fibrosos em estrutura quaternária que podem ser formados *in vitro* ou *in vivo* (Sachse *et al.*, 2006).

As estruturas de amilóides foram originalmente associadas apenas às doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Blanco *et al.*, 2012) e, posteriormente, foram identificadas como estruturas produzidas por microrganismos com diversas funções, recebendo o nome de amilóides funcionais (Romero & Kolter, 2014). Os amilóides funcionais já foram identificados em *Escherichia coli* (Gerven *et al.*, 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Zeng *et al.*, 2015), *Mycobacterium tuberculosis* (Alteri *et al.*, 2007) e *Streptococcus mutans* (Oli *et al.*, 2012), e se mostraram importantes na formação de biofilmes dessas espécies. Assim, amilóides tornaram-se alvo no controle de biofilmes de diversas espécies (Hengge, 2019; Romero & Kolter, 2014; Taglialegna, Navarro, *et al.*, 2016). A aplicação de compostos polifenóis no controle da formação de diferentes tipos de amilóides tem sido estudada (Bastianetto *et al.*, 2008; Kobayashi *et al.*, 2020; Phan *et al.*, 2019), com um destaque para o EGCG, o qual demonstrou influência na formação de amilóides por cepas bacterianas das espécies *Escherichia coli* (Serra *et al.*, 2016) e *Streptococcus mutans* (Oli *et al.*, 2012). Assim, a análise de culturas de *S. sanguinis* crescidas na presença de EGCG poderia contribuir

para o estudo da participação de fibras amilóides na formação de biofilmes por esta espécie.

Sendo assim, o objetivo geral desse trabalho é identificar e caracterizar a presença de estruturas amilóides na espécie *S. sanguinis* sob diferentes condições de cultivo, e avaliar o efeito destes polímeros na formação de biofilme por esta espécie.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Streptococcus sanguinis* como espécie comensal pioneira dos biofilmes dentários

O microbioma da cavidade oral inclui um grande número de espécies bacterianas, sendo que espécies comensais de estreptococos são muito abundantes nos diferentes nichos bucais (Belda-Ferre *et al.*, 2012). Entre estas, *Streptococcus sanguinis* desempenha papel importante na iniciação dos biofilmes dentários (Hung *et al.*, 2016; Kreth *et al.*, 2018), podendo ser detectada também na saliva (Francavilla *et al.*, 2014) e mucosa (Seoudi *et al.*, 2015). Por se tratar de uma espécie anaeróbia facultativa, *S. sanguinis* é encontrado em abundância tanto na região supragengival (Abusleme *et al.*, 2013) quanto subgengival (Hintao *et al.*, 2007). Os biofilmes formados na cavidade oral são compostos por comunidades microbianas estruturadas por uma matriz extracelular autoproduzida, que variam em composição dependendo das características biofísicas, nutricionais e exposição aos diversos componentes imunológicos do hospedeiro, além das interações competitivas e cooperativas entre as espécies microbianas que se estabelecem em cada estágio de formação e maturação do biofilme. A espécie *S. sanguinis* é considerada uma espécie comensal benéfica de biofilmes dentários, pois são capazes de inibir o estabelecimento de espécies capazes de afetar a homeostase dos biofilmes dentários sob condições específicas e consequentemente promover doenças como a cárie dentária ou doença periodontal (B. Zhu *et al.*, 2018). Uma vez expostas à saliva, as superfícies do esmalte dentário são recobertas por uma camada acelular altamente estável, designada película adquirida (PA), formada por glicoproteínas da saliva, do soro, componentes epiteliais e também derivados dos microrganismos (Lee *et al.*, 2013). *S. sanguinis* tem alta capacidade de interagir com a PA e iniciar a formação dos biofilmes dentários (Zhu *et al.*, 2018) e, assim como outras espécies de estreptococos comensais (*Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis*), são predominantes nas superfícies dentárias durante as primeiras 4 a 8 h de formação de biofilmes (Diaz *et al.*, 2006). Diferentes funções fisiológicas de *S. sanguinis* parecem então modular a sucessão de espécies microbianas dos biofilmes dentários e altos níveis de *S. sanguinis* nos biofilmes dentários foram associados com a menor susceptibilidade à cárie dentária em diferentes estudos clínicos (Caufield *et al.*, 2000).

2.2 Mecanismos moleculares de formação de biofilmes por *S. sanguinis*.

Os mecanismos moleculares de formação de biofilmes por *S. sanguinis* são ainda pouco compreendidos. As etapas iniciais de colonização das superfícies dentárias por esta

espécie envolvem a ligação de componentes de superfície *S. sanguinis* a componentes da PA, o que é consistente com estudos *in vitro* demonstrando que *S. sanguinis* requer o recobrimento das superfícies com a saliva humana para iniciar biofilmes (Moraes *et al.*, 2014). *S. sanguinis* é uma das espécies com maior número de proteínas ancoradas à parede celular (n=33) e lipoproteínas (n=60), quando comparada a outras espécies de estreptococos da microbiota humana, o que sugere alta capacidade de interagir com componentes do hospedeiro, como por exemplo a película adquirida e/ou de outras espécies bacterianas (Xu *et al.*, 2007). São, entretanto, poucos os componentes de superfície desta espécie cuja ligações à PA tenham sido experimentalmente demonstrada, em parte pela dificuldade de obtenção de mutantes e porque diversas destas proteínas apresentam funções redundantes (Xu *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2018). Há evidências de que pelo menos três classes de estruturas de superfície de *S. sanguinis* estão envolvidas na ligação à PA. Estas incluem as fímbrias formadas por proteínas codificadas pelos genes *pilABC*, a lipoproteína SsaB e a proteína rica em serina SrpA, a qual se liga a ácido siálico de diversas glicoproteínas da saliva e do hospedeiro (Zhu *et al.*, 2018). A produção de proteases de IgA1S, anticorpos muito abundantes na saliva, também é uma característica comum de colonizadores pioneiros dos dentes (Kilian *et al.*, 1996), hipoteticamente porque as IgA1-proteases produzidas por estes microrganismos promovem o desbloqueio de suas adesinas de superfície, favorecendo a ligação irreversível aos componentes da PA. Entretanto, tal mecanismo não foi entretanto, experimentalmente demonstrado.

Além da interação estável com componentes da PA, outro mecanismo importante nas fases iniciais de formação de biofilmes por *S. sanguinis* é a produção de DNA extracelular (Moraes *et al.*, 2014). *S. sanguinis* libera DNA para o meio externo num processo independente de autólise, o qual não é completamente compreendido, mas dependente da produção de H₂O₂ (Kreth *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2014). Para produzir H₂O₂, *S. sanguinis* expressa a enzima piruvato-oxidase (SpxB, codificada por *spxB*), a qual converte fosfato inorgânico e O₂ em CO₂, H₂O₂ e acetil fosfato (Ramos-Montañez *et al.*, 2008; Redanz *et al.*, 2018). Assim, a atividade de SpxB contribui não somente para a redução da tensão de oxigênio molecular local, mas para o aumento da biomassa de biofilmes decorrente da produção de DNA extracelular (eDNA) (Redanz *et al.*, 2018). A produção de eDNA pode contribuir ainda para a formação de estruturas de outros exopolímeros envolvidos na biogênese da matriz extracelular, incluindo-se exopolissacarídeos e fibras amilóides.

S. sanguinis produz exopolissacarídeos (EPS) a partir da sacarose (glucanos), entretanto estes são predominantemente solúveis (Kopec *et al.*, 2001). A enzima envolvida na síntese de glucanos a partir da sacarose foi designada a glucosiltransferase P (GtfP). A GtfP

de *S. sanguinis* difere das Gtfs produzidas pela espécie cariogênica *Streptococcus mutans* (GtfB e GtfC), porque estas últimas são capazes de sintetizar glucanos insolúveis altamente estáveis, os quais intensificam o aumento da biomassa e acúmulo microbiano no biofilme e consequentemente, o potencial deste de causar desmineralização dentária a partir do metabolismo fermentativo microbiano. Glucanos sintetizados por GtfP entretanto, tem modesto efeito na formação de biofilmes em co-culturas com *S. mutans* (Yoshida *et al.*, 2014). Por outro lado, o gene *gtfP* é ativado durante as fases iniciais da formação de biofilmes por *S. sanguinis* (Moraes *et al.*, 2014), sugerindo importância nas fases iniciais de colonização dentária. Uma das hipóteses é que o glucanos solúveis produzidos por *S. sanguinis*, se ligam ao eDNA estabilizando este polímero como componente da matriz extracelular. Estudos em *S. mutans* e em outras espécies bacterianas sugerem que a interação entre eDNA e EPS confere estabilidade à matriz de biofilmes (Liao *et al.*, 2014; Okshevsky *et al.*, 2015).

A produção de outros exopolímeros durante o crescimento em biofilmes, como os amilóides, ainda precisa ser estudada. Proteínas amilóide ou fibras amilóides representam uma estrutura fibrosa quaternária de cross- β -sheet (folhas Beta) composta por agregados ordenados de peptídeos ou proteínas que demonstram propriedades biofísicas comuns (Nilsson, 2004). Além disso, apresentam polimerização de unidades proteicas simples repetidas, sem gasto de ATP; a síntese de proteínas amilóide tem baixo custo metabólico (DePas & Chapman, 2012; Otzen, 2010; Otzen, 2010; DePas, *et al.*, 2012). Essas estruturas são resistentes à desnaturação sob condições biofísicas adversas e resistentes à degradação por proteases. Amilóides representam um mecanismo importante de sobrevivência microbiana em resposta a diferentes estresses ambientais (Blanco *et al.*, 2012).

O termo amiloide foi utilizado pela primeira vez pelo botânico alemão Matthias Scheiden (1804-1881), que observou estas estruturas ao utilizar uma técnica com ácido iodado sulfúrico em tecidos vegetais para identificar a presença amido. Mas foi o patologista alemão Rudolf Virchow que aplicou na literatura médica esse termo em 1854, para descrever estruturas que apresentavam a mesma reação de iodo e ácido sulfúrico que as descritas anteriormente por Scheiden em tecidos do sistema nervoso (Tanskanen, 1881). Quando se estuda o papel dos amilóides funcionais na construção de uma matriz extracelular em biofilmes microbianos, um aspecto muito importante deve ser considerado, sobre o que desencadeia ou auxilia na polimerização dessas fibras (Buell *et al.*, 2014). Diversos fatores físico-químicos, por exemplo o pH, assim como fatores ambientais, influenciam na polimerização das fibras amilóides (Barran-Berdon *et al.*, 2020; Moores *et al.*, 2011; Taglialegna *et al.*, 2016).

2.2 Amilóides funcionais e seu papel na formação de biofilmes bacterianos

A formação e acúmulo de amilóides em tecidos foram inicialmente descritas como associados a doenças degenerativas como Parkinson, Alzheimer ou Huntington (Blanco *et al.*, 2011). Nesses casos, resultam do dobramento errôneo das proteínas expressas pelo próprio indivíduo (Schwartz *et al.*, 2012). No entanto fibras amilóides foram encontradas em insetos, fungo e bactérias desempenhando importantes funções benéficas a esses organismos e por isso o termo “amilóide funcional” foi criado para diferenciar essas estruturas das responsáveis por doenças. As primeiras amilóides funcionais descritas, foram as fibras curli produzidas por *Escherichia coli* (Romero & Kolter, 2014). Essas amilóides funcionais também foram identificadas em biofilmes microbianos naturais (Larsen *et al.*, 2007).

As proteínas curli, são amilóides produzidas por muitas *Enterobacteriaceae* e são o principal componente proteico da matriz extracelular (Barnhart & Chapman, 2010). As fibras curli foram descobertas em 1980 em cepas de *E. coli* que causavam mastite bovina (Barnhart & Chapman., 20). Como amilóides típicos, as fibras amilóides curli têm estrutura de fibras ordenadas em folhas- β , resistência a proteases e capacidade de se ligar aos corantes Vermelho Congo (Congo Red; CR) e Tioflavina T (Thioflavin T; ThT) (Hammar *et al.*, 1995). Outros exemplos de fibras semelhantes às fibras curli foram identificadas em espécies do gênero *Pseudomonas*, incluindo-se *Pseudomonas aeruginosa* (Dueholm *et al.*, 2013). As fibras curli conferem diversas vantagens biológicas as cepas de *E. coli* produtoras, como interação com o tecido do hospedeiro, formação de biofilme e até evasão do sistema imunológico (Barnhart *et al.*, 2006). Outros microrganismos já foram identificados como produtores de amilóides funcionais, variando sua função. Em *Pseudomonas* sp. as proteínas amilóides estão envolvidas na formação de biofilme (Duehom *et al.*, 2010), assim como em *S. aureus* a proteína presente na superfície conhecida como Bap também apresenta características de amilóide (Taglialegna *et al.*, 2016) e cepas produtoras dessas proteínas apresentam aumento na formação de biofilme além de menor suscetibilidade à tratamentos de antibióticos (Cucarella *et al.*, 2002).

Streptococcus mutans também vem sendo estudada como produtora de proteínas amilóides assim como sua associação na formação de biofilme (Oli *et al.*, 2010). Essas amilóides funcionais também foram identificadas em microrganismos eucariotos, leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* apresentaram formação de proteínas amilóides, estando essas estruturas relacionadas a agregação celular, pois tais reações foram inibidas na presença de corantes que se ligam as proteínas amilóides, impedindo (Ramsook *et al.*, 2010).

Assim como sua função pode variar de acordo com os microrganismos, a composição e origem das fibras amilóides microbianas varia de acordo com o microrganismo, fibras amilóides como as encontradas em *E. coli* são produzidas por mecanismos específicos (Taglialegna *et al.*, 2016). Entretanto existem outras proteínas de superfície que apresentam características de amilóide, como a Adesina P1 (também conhecida como Ag I/II) em *S. mutans*, foi a primeira proteína com características de amilóide nessa espécie (Oli *et al.*, 2012). Mecanismos específicos como em *E. coli*, onde a produção das fibras curli ocorre através de dois operons *csgBAC* e *csgDEFG*. Em outros microrganismos, a produção de amilóide pode envolver outra proteína, como por exemplo, em *S. aureus* onde a proteína amiloide é derivada da proteína BAP, a qual sob determinadas condições como baixo pH e baixas concentração de cálcio, essas proteínas podem assumir propriedades de fibras amilóides (Cucarella *et al.*, 2001). Entre as bactérias bucais, a produção de amilóides foi descrita apenas para a espécie *Streptococcus mutans*. Nesse grupo, como mencionado anteriormente, foi demonstrado que uma das proteínas capazes de produzir amilóide é a adesina P1 (também conhecida como antígeno I/II ou PAc) (Oli *et al.*, 2012).

A adesina P1 foi uma das primeiras adesinas ancoradas na parede celular identificada em bactérias Gram-positivas. Essa proteína é responsável pela ligação do *S. mutans* à superfície dos dentes, por mecanismos independentes de sacarose, e tem sido foco de estudos que buscam terapias de controle da cárie dentária. Os genes que codificam as proteínas Ag I/II são encontrados entre espécies *Streptococcus* nativas da boca humana, bem como em *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae* e *S. suis* (Brady *et al.*, 2010). Há evidências de que além da adesina P1, outras proteínas expressas por cepas de *S. mutans* podem produzir fibras amilóides; amilóides foram detectadas em culturas de cepas incapazes de produzir P1, sugerindo que P1 não é a única proteína capaz de produzir amilóides (Oli *et al.*, 2012).

Uma vez que fibras do tipo amilóide parecem ser um componente comum de diversos biofilmes microbianos, há grande interesse em identificar os mecanismos de formação destas fibras e desenvolver métodos que interfiram neste processo, como alternativa para controle de biofilmes (Taglialegna *et al.*, 2016).

Embora haja evidências de que diferentes proteínas de superfície bacterianas são capazes de adquirir características amilóides como a adesina P1 (Brady *et al.*, 2010) e WapA (Besingi *et al.*, 2017) de *S. mutans* assim com a proteína Bap em *S. aureus* (Taglialegna *et al.*, 2016), ainda não existem estudos sobre a formação de amilóide envolvendo proteínas de superfície na espécie *S. sanguinis*. Apesar de não expressar proteínas da família das adesinas P1 (antígeno I/II), *S. sanguinis*, como mencionado anteriormente, apresenta uma grande

variedade de proteínas ancoradas (Xu *et al.*, 2007). Essa grande variedade de proteínas presentes na superfície dos *S. sanguinis* e sua capacidade de formação de biofilme reforçam a hipótese de que esta espécie seja capaz de produzir amilóide por mecanismos ainda não conhecidos.

2.3 Propriedades comuns de amilóides e amilóides funcionais e características de detecção

A despeito da diversidade de tipos de fibras amilóides de origem humana e microbiana, estes polímeros proteicos parecem compartilhar uma série de características estruturais e bioquímicas que permitem sua identificação e análise em modelos *in vitro* e *in vivo* (Reichhardt *et al.*, 2015). Entre estas propriedades comuns está a afinidade aos corantes Vermelho Congo (VC) e tioflavina T (TT) (Romero & Kolter, 2014).

2.4 O corante Vermelho Congo

O corante conhecido como vermelho Congo foi sintetizado pela primeira vez em 1983 pelo químico Paul Böttiger, enquanto tentava sintetizar um indicador de pH, criou um corante vermelho brilhante que não exigia um mordente para manchar fibras têxteis. Mais tarde, esse corante ficou conhecido como Vermelho Congo (VC) (Steensma, 2001).

Os corantes são geralmente compostos aromáticos e heterocíclicos, podendo ou não serem tóxicos. O VC, é formado por um sal de sódio do ácido benzidinodiazó-bis-1-naftilamina-4-sulfônico (fórmula: $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$; peso molecular: 696,66 g / mol) (Jalandoni-Buan, *et al.*, 2001).

Muitos corantes de anilina foram testados para possíveis corantes histológicos (Alturkistani *et al.*, 2015). O VC foi utilizado em 1986, primeiramente como indicador de pH do ácido do trato intestinal de animais (Yakupova *et al.*, 2019). A utilização do VC como indicador da presença de proteínas amilóide ocorreu por acaso em 1922 pelo médico, Hans Hermann Henhold (Howie & Brewer, 2009) e vem sendo utilizada para amiloides *in vivo* e *in vitro* desde então (Yakupova, *et al.*, 2019).

O VC pode ser incorporado em meio de cultura com ágar, como um indicativo inicial da produção de amilóide caracterizada pela formação de colônias de coloração vermelho escuro ou mesmo marrom (Otzen, 2010). Em *E. coli*, as fibras amilóides curli são detectadas

através da cultura em meio sólido ágar acrescido de VC, e posterior detecção do sequestro deste corante pelas colônias formadas analisada pela formação de halos descorados quando as colônias são removidas (Reichhardt *et al.* 2015), porém essa não é uma técnica específica pois o VC pode também se ligar a outros compostos como a celulose (Yakupova *et al.*, 2019) .

O amilóide corado pelo VC tem propriedades ópticas muito particulares, as quais ainda não foram completamente explicadas, embora possam ser entendidas a partir dos princípios da óptica física. Vermelho Congo na presença de amilóide apresenta uma aparência vermelho-alaranjada sob microscopia de luz e uma birrefringência verde-maçã (*green-apple*) sob luz polarizada (Howie & Brewer, 2009; Kyle, 2001).

Quando uma amostra é corada com VC e observada em microscopia de polarização e os filtros polarizadores (polarizador e analisador) são inseridos no caminho da luz, várias cores poderão ser vistas, variando de acordo com o grau de rotação de um filtro em comparação com o outro. Esses filtros convertem a luz comum em luz polarizada, que viaja apenas em um plano linearmente, e quando os filtros são colocados com uma diferença de 90°, apenas os materiais birrefringentes são capazes de atravessar, deixando o fundo escuro e os materiais birrefringentes com cores brilhantes. Proteínas do tipo amilóide quando corados com o VC apresentam uma birrefringência verde-maçã (*green-apple*) sob as condições mencionadas. E isso é um método universalmente relatado como evidência da presença de proteínas amilóides (Howie & Owen-Casey, 2010).

2.5 A Tioflavina T

A capacidade de detecção de fibras amilóides pelo corante Tioflavina foi demonstrado primeiramente em 1959 (Biancalana & Koide, 2010) e nos últimos 10 anos, passou de um teste simples para detecção de proteínas amilóides em casos de doenças para estudos das estruturas e mecanismos de formação de fibras amilóides (Sulatskaya *et al.*, 2017).

O TT é um corante fluorescente mais utilizado no estudo de fibras amilóides e tornou-se um “padrão ouro” para coloração seletiva e identificação de amilóides *in vivo* e *in vitro* (Biancalana & Koide, 2010). Quando adicionado a amostras contendo depósitos ricos em folhas- β , tais como a estrutura quaternária de *cross- β -sheet* de fibrilas amilóide, ela emite uma fluorescência forte com excitação e emissão máximos em comprimentos de onda de aproximadamente 440 e 490 nm, respectivamente (Nilsson, 2004) e na ausência de fibras

amilóides o TT emite uma fluorescência mais fraca de excitação e emissão de 350 e 458nm respectivamente (Naiki *et al.*, 1990) ou 385 e 445nm (Levine, 1993).

Tioflavina T consiste em um par de benzotiazol e anéis benzamínicos girando livremente em torno de uma ligação C-C compartilhada (Dzwolak & Pecul, 2005) (cuja principal característica é o aumento na emissão de fluorescência quando se liga a fibras amilóides (Khurana *et al.*, 2005), sendo o corante fluorescente mais utilizado no trabalho com fibras amilóides (Biancalana & Koide, 2010). A fluorescência é aumentada quando essa mobilidade entre os anéis benzamínico é dificultada ou bloqueada, como por exemplo na presença de solventes viscosos, ocorre um aumento na emissão de fluorescência, no caso da presença de fibras amiloides, ocorre a formação de um complexo TT-amilóide onde essa rotação é bloqueada (Khurana *et al.*, 2005). Atualmente não há um consenso sobre as concentrações ideais na detecção de amilóides (Xue *et al.*, 2017).

2.6 O EGCG no tratamento de biofilmes

A formação e acúmulo de fibras amilóides são a causa de muitas doenças humanas, como Parkinson, Alzheimer (Ehrnhoefer *et al.*, 2006), doenças de príons e diabetes tipo II. Atualmente não existem terapias aprovadas para o tratamento e combate dessas doenças (Gazit, 2005), por isso muitos compostos são estudados como possíveis tratamentos e controle de fibras amilóides.

Um grupo muito estudado e que vem apresentando diversos compostos que demonstram atuar contra a formação de proteínas amilóides é o grupo dos polifenóis. Esse grupo é representado por moléculas naturais ou sintéticas que apresentam um ou mais anéis fenólicos aromáticos e podem ser encontrados em altas concentrações em diversos alimentos naturais, como, nozes, frutas silvestres e diversas plantas (Porat *et al.*, 2006). Diversos compostos desse grupo mostraram propriedades capazes de inibir a formação de fibras amilóide *in vitro*, como NDGA (ácido nordiidroguaiarético), Myr (miricetina), Mor (morin) (Ono *et al.*, 2002), baicaleína (Zhu *et al.*, 2007) e o EGCG (epigallocatequina galato) (Wobst *et al.*, 2015).

O polifenol epigallocatequina galato (EGCG) é um componente ativo do chá verde (Franko *et al.*, 2018), esse composto se mostrou eficaz na inibição da formação de alfa-sinucleína e da amilóide-beta (Ehrnhoefer *et al.*, 2008), estruturas tipicamente associadas a dois

distúrbios neurodegenerativos conhecidos: Alzheimer e Parkinson (Marsh & Blurton-Jones, 2012).

A descoberta da presença de fibras amilóides em diversos tipos de biofilmes levou essas proteínas serem consideradas possíveis alvos, devido as consequências que essas comunidades microbianas são capazes de causar (Taglialegna, *et al.*, 2016), portanto os compostos que demonstraram serem eficazes contra fibras amilóides foram testados para analisar sua atividade contra biofilmes bacterianos, como por exemplo o EGCG (Serra *et al.*, 2016) que foi um dos primeiros polifenóis a serem testados contra bactérias (Hengge, 2019).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral desse estudo é caracterizar a produção de fibras amilóides por cepas de *S. sanguinis*, e avaliar o papel destes polímeros na formação de biofilmes.

3.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos envolvem a caracterização na produção de fibra amilóides de nove cepas *S. sanguinis* isoladas da cavidade bucal (n = 7) ou da corrente sanguínea (n = 2) com a cepa referência SK36 e a cepa de *S. mutans* (UA159).

Para esta caracterização foram feitas as seguintes análises:

3.1.1. Detecção de birrefringência em colônias e biofilme de *S. sanguinis*

3.1.2 Análise em amostras de sobrenadante utilizando o corante Tioflavina T por microscopia confocal.

3.1.3 Análise em amostras de sobrenadante utilizando o corante Tioflavina T por espectrofluorimetria.

3.1.4 Analise sobre o efeito do EGCG na formação de biofilmes por cepas *S. sanguinis* sob diferentes condições de crescimento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas estudadas e condições de cultivo

As cepas de *S. sanguinis* utilizadas no estudo que estão listadas na tabela 1 foram fornecidas pelo Prof. Dr. Mogens Kilian, Universidade de Aarhus, Dinamarca e a cepa de *Streptococcus mutans* UA159 foi utilizada como controle em todos os ensaios realizados. Para todos os experimentos, as cepas foram inoculadas a partir de estoques congelados (a -70°C) em placas de Petri contendo BHI ágar e incubadas por 24-30 h a 37°C em atmosfera de 10% CO₂, respectivamente. Um total de cinco colônias foram então transferidos para tubos de ensaio com 5 ml de meio BHI, e incubados nas mesmas condições durante 18h.

Tabela 1. Cepas estudadas

CEPA	SÍTIO DE ISOLAMENTO	Fonte e/referência
<i>Streptococcus sanguinis</i>		
SK36	Biofilme dental	ATCC; Xu <i>et al.</i> , 2007
SK49	Biofilme dental	Mogens Kilian; Kilian & Holmgren, 1981
SK72	Biofilme dental	Mogens Kilian; Kilian & Holmgren, 1981
SK115	Biofilme dental	Mogens Kilian; Kilian & Holmgren, 1981
SK160	Biofilme dental	Mogens Kilian
SK330	Cavidade oral	Mogens Kilian
SK353	Cavidade Oral	Mogens Kilian
SK678	Sangue	Mogens Kilian
SK1056	Sangue	Mogens Kilian
<i>Streptococcus mutans</i>		
UA159	Isolada de criança com lesões de cáries ativas	ATCC

4.2. Amostras de saliva humana

Os ensaios da formação de biofilme na presença e ausência de EGCG foram realizados em meio BHI acrescidos de 1% de sacarose e suplementados ou não com 10% de

saliva humana esterilizada (BHIS). As amostras salivares utilizadas foram coletadas, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOP- UNICAMP (CEP-FOP; proc. 3.365.892) de um voluntário de 30 anos de idade com boa saúde geral e bucal (ausência de lesões de cárie ou de doença periodontal), avaliação realizada pelo Dr. Victor Aragão Abreu de Freitas, CRO-CE 8261, não fumante, que não tomava medicamentos. A coleta de saliva foi realizada no período da manhã, após período de pelo menos 2 h de jejum e processada como descrito em estudos anteriores (Kalfas *et al.*, 1991; Camargo *et al.*, 2018), com algumas modificações. A saliva foi coletada em tubo falcon de 50 mL sob banho de gelo, após estimulação de salivação pela mastigação de parafilm (Bemis). As amostras foram então acrescidas de agente redutor ditioneitol (DTT) (50 µL de solução a 2,5 mM para cada 20 mL de saliva), para permitir a filtração. As amostras foram então clarificadas através de centrifugação (40.000 x g; 15 min, 4°C) e a seguir esterilizadas por filtração ao vácuo através de filtros de 0,22 µm de diâmetro (Millipore Express™ plus), então as amostras foram estocadas em alíquotas de 1.5 mL a -70 °C e descongeladas no momento da utilização.

4.3 Procedimentos de preparação de Vermelho Congo, Tioflavina T e EGCG.

O preparo do corante VC para os ensaios de birrefringência foram realizadas duas horas antes do ensaio, de acordo com estudo anterior (Oli *et al.*, 2012), dissolvendo 2g de NaCl em 20 ml de H₂O e 80 ml de VC em etanol 100%, essas duas soluções foram combinadas e homogeneizadas com o auxílio de um agitador magnético e então filtradas com filtros para seringa membrana polietersulfona com poros de 0,22 µm de diâmetro (Kasvi K18-230) e armazenados em temperatura ambiente.

O composto EGCG (Sigma-Aldrich-50299 - ≥95.0% HPLC- Lot # SLBZ2865) foi preparado em uma solução estoque de 20 mM, dissolvendo 0,0046 mg em 5 ml de H₂O (seguindo recomendações do fabricante) e filtrado em filtros para seringa com membrana de polietersulfona com poros de diâmetro de 0,22 µm (Kasvi K18-230) para esterilização da solução. Essa solução foi então armazenada a -20°C e descongelada na hora do uso, sendo adicionada ao meio de cultura antes da inoculação dos microrganismos.

O corante TT (Sigma-Aldrich) foi preparado como descrito em estudo anterior (Oli *et al.*, 2012) no dia do ensaio, dissolvendo 8 mg de TT em um tampão fosfato (10mM Na₂HPO₄, 150mM NaCl, pH 7,0) e então filtrada utilizando filtros para seringa de membrana de polietersulfona com poros de 0,22 µm de diâmetro (Kasvi K18-230) e então armazenada no escuro em uma temperatura de -20°C e descongelado no momento da utilização.

4.4 Detecção de birrefringência em colônias e biofilme de *S. sanguinis*

4.4.1 Análise em colônias crescidas em placas de petri

A análise de produção de amilóide em colônias bacterianas, foi realizada como descrito em estudo anterior (Oli *et al.*, 2012), com algumas modificações. As cepas foram inoculadas a partir de estoques congelados (a -70°C) em placas de Petri contendo BHI ágar e inoculadas por 24 a 30 h a 37°C em atmosfera de 10% de CO₂. Um total de cinco colônias destas culturas foi então coletado com o auxílio de um *swab* estéril e ressuspendidas sobre uma lâmina de vidro em 10µL de solução de VC (como descrito no item 3.3). As lâminas contendo amostras foram analisadas sob luz polarizada utilizando um Microscópio com Sistema Fotodocumentação e Luz Polarizada - Leica – DMLP, disponível no Centro de Microscopia e Imagem (CMI) da FOP-UNICAMP, com o polarizador ajustado em um ângulo de 90° em relação ao analisador. As lâminas contendo as amostras foram visualizadas sob aumento de 100x.

4.4.2 Análise de birrefringência em biofilme maduro

As análises de birrefringência de biofilmes foram realizadas como descrito em estudo anterior (Oli *et al.*, 2012) com algumas modificações. Os biofilmes analisados foram obtidos em placas de poliestireno de 96 poços, como descrito em estudo anterior (Camargo *et al.*, 2018), com algumas modificações. Resumidamente, volumes de 500 µL de cultura de cada cepa em BHI em fase exponencial (A_{550nm} 0,3) foram diluídas 1:10 em 4,5 ml de meio BHI ou BHIS (BHI suplementado com 10% de saliva humana estéril (coletada como descrito anteriormente) acrescidos de 1% de sacarose e então transferidos em quadruplicatas para as placas de poliestireno de 96 poços (Cralplast), as quais foram então incubadas (37°C) em aerobiose sob agitação (agitador de placas Nova instrumento-Thermo-shaker, 240 rpm) durante 18 h. O restante das culturas diluídas foi incubado paralelamente sob as mesmas condições, para quantificação do crescimento planctônico (durante 18 h). Após a incubação, as suspensões das culturas de cada poço contendo os biofilmes foram removidas com o auxílio de micropipeta e os biofilmes ressuspendidos em 20 µL de solução de VC a uma concentração de 7, 2mM e homogeneizados por pipetagem e transferidos para uma lâmina de vidro. A birrefringência foi analisada sob luz polarizada utilizando microscópio com Sistema Fotodocumentação e Luz

Polarizada - Leica – DMLP, disponível no Centro de Microscopia e Imagem (CMI) da FOP-UNICAMP, com o polarizador ajustado em um ângulo de 90° em relação ao analisador. As lâminas contendo as amostras foram visualizadas sob aumento de 100x. As absorbâncias (A_{550nm}) das culturas planctônicas obtidas paralelamente foram determinadas após a homogeneização em agitador de tubos.

4.5 Análise de formação de amiloide em sobrenadantes de cultura de *S. sanguinis*

4.5.1 Preparação das amostras de sobrenadante de culturas para análise de formação de fibras amilóides.

A presença de fibras amiloide foi analisada em amostras de sobrenadante de cultura planctônica de todas as cepas estudadas, coradas com TT e analisadas em leitor de microplacas com capacidade de detecção de fluorescência (espectrofluorímetro) e microscopia de confocal. A coleta e diálise da cultura sobrenadante foi realizado como em estudos anteriores (Harth-Chu *et al.*, 2019) com algumas modificações. Resumidamente, um total de cinco colônias de cada cepa obtidas a partir de culturas em placas de BHI ágar foram transferidas para tubos de ensaio com 5 ml contendo Meio Quimicamente Definido (MQD) (Loo *et al.*, 2000), os quais foram incubados por 18 h a 37°C em atmosfera de 10% CO₂. Em seguida, as amostras das culturas de cada cepa foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador de tubos Vórtex por 10 segundos e 400 µL da cultura foram transferidos para 39,6 mL de MQD fresco e incubado nas mesmas condições, 37°C em atmosfera de 10% CO₂, por 18 horas. Após a incubação, as culturas foram homogeneizadas novamente por 20 seg. e volumes de 400µL utilizados para leitura da absorbância (A_{550nm}). O volume restante (39,6 mL) foi centrifugado por duas vezes (6.000 × g; 4°C; 4 min.) para remoção das células. As amostras de sobrenadante tiveram o pH neutralizado com a adição de NaOH (1M) e fenilmetilsulfonil (PMSF; para uma concentração final de 10 µM), para a inativação de proteases. Em seguida, essas amostras foram dialisadas por durante 18 h a 4°C utilizando um contra tampão fosfato (Na₂HPO₄; NaH₂HPO₄; 0,2M; pH 6,5) gelado e depois contra tampão Tris-HCl (0,125 M; pH 6,8; diluído 1:100) por 48 h. As amostras então foram concentradas através de liofilização e suspensão em volume 100 vezes menor do que o original. As concentrações de proteína das amostras foram então determinadas utilizando-se os reagentes de Bradford® (Sigma) de acordo com as orientações do fabricante. A integridade das amostras proteicas foi verificada através das análises de 10 µg de proteína de cada amostra em géis de SDS-PAGE a 8% e corados por *Coomassie blue*.

Para induzir a formação de amilóide nos sobrenadantes de cultura, as amostras de 700 µL foram ajustadas para uma concentração de 0,5 mg/ml de proteína em tampão contendo 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl (pH 8,0) e submetidas a agitação em um microtubo contendo uma barra magnética, por 48 h a 4°C (Oli *et al.*, 2012).

4.5.2 Análise das amostras de sobrenadante coradas com TT por microscopia confocal

Para análise qualitativa da presença de amilóide utilizando microscopia confocal de varredura a laser, foram utilizadas amostras de sobrenadante dialisadas e concentradas foram submetidas a agitação por 48h (item 4). Em microtubos foram adicionados 10µL da amostra de proteínas provenientes de sobrenadante de cada cepa juntamente com 10µL da solução contendo TT (item 3.3) e analisadas com uma excitação e emissão de 450 e 482 nm respectivamente segundo recomendações do fabricante. As imagens foram feitas utilizando confocal (LAICA TCS SP5 Microscope, Leica MicroSystems, Wetzlar, Germany) disponível no centro de microscopia da Centro de Microscopia e Imagem (CMI) da FOP-UNICAMP.

4.5.3 Análise das amostras de sobrenadante coradas com TT por espectrofluorimetria

A quantificação de proteínas amilóides foi também realizada em amostras de sobrenadante obtidas com e sem agitação, obtidas como descrito no item 4.5.1. Para isto, volumes de 250µL adicionadas de tioflavina T (TT) a uma concentração final de 2,5µM. Estas amostras foram então transferidas em quadruplicata (100µL por poço) para placas de poliestireno preto de 96 poços (Corning 96 Well Black Polystyrene). Estas foram então lidas em espectrofluorímetro GloMax® Discover System com o filtro AFC (405nmEx/495–505nmEm) disponível no Departamento de Ciências Biológicas – LCB, ESALQ-USP.

4.6 Formação de biofilme na presença de EGCG

Para investigar a influência de amilóide na formação de biofilmes por cepas *S. sanguinis*, a biomassa de biofilmes formados em placas de poliestireno por 18 h como descrito no item 4.4.2. foi comparada entre cepas crescidas em BHI ou BHIS suplementado com 1% de sacarose, na presença ou ausência de polifenol(–)-galato de epigallocatequina (EGCG; *epigallocatechin gallate*) em uma concentração final de 1mM (0,482 mg/mL). Para suplementação do meio com EGCG, volumes de 50µl de solução estoque de EGCG (item 4.3) foram descongelados e adicionados ao meio de cultura para concentração final de 1 mM (Oli *et al.*, 2012). Uma solução equivalente sem o composto EGCG foi utilizada em controles

negativos. Após o crescimento de 18 h, a biomassa dos biofilmes formados foi determinada. Para isto, o sobrenadante das placas foi removido por pipetagem e os biofilmes então lavados com água destilada por três vezes, com cuidado devido a fragilidade do biofilme formado pelas cepas *S. sanguinis*, para remoção das células pobremente aderidas. A seguir, estes foram corados com 200 µL com uma solução de violeta cristal a 1% durante 30 minutos em temperatura ambiente e submetidos e novamente passados por duas lavagens utilizando H₂O destilada. Após a secagem sob temperatura ambiente (durante 1 a 2 h), o corante dos biofilmes foi então solubilizado em volumes de 200 µl de etanol durante incubação por 30 min. sob temperatura ambiente. Volumes de 100 µl destas eluições foram então transferidos para novas placas para leitura das absorbâncias (A_{575nm}) em leitor de ELISA (VersaMAX, molecular devices, EUA), cujos valores foram expressos como medida indireta de biomassa dos biofilmes. O crescimento planctônico das culturas também foi monitorado paralelamente, com descrito anteriormente (item 4.4.2).

4.7 Análises estatísticas

As comparações da formação de amilóide dos sobrenadantes de culturas de *S. sanguinis* quantificados por espectrofluorimetria e comparações das medidas de biomassa de biofilmes na presença ou não de EGCG foram investigadas através de análise de variância não paramétrica usando-se teste de Mann-Whitney. As análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 6 para as comparações estatísticas. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Análise de birrefringência de colônias bacterianas e amostras de biofilmes das cepas *S. sanguinis*

Para detectar a presença de amilóide, cepas de *S. sanguinis* foram crescidas em placas de Petri contendo BHI ágar e as colônias coradas com VC. Como mostrado na **Figura 1**, podemos observar coradas em vermelho, sem a utilização da luz polarizadas as colônias coradas com o vermelho congo. Quando observadas sob microscopia de luz polarizada (LP), as colônias não apresentaram birrefringência, indicando assim a ausência ou níveis não detectáveis de amilóides. A cepa *S. mutans* UA159 (ATCC) foi utilizada como controle positivo apresentou uma leve birrefringência verde, indicativa da presença de amilóide. Como controle negativo foi utilizada uma solução contendo apenas VC para todos os experimentos.

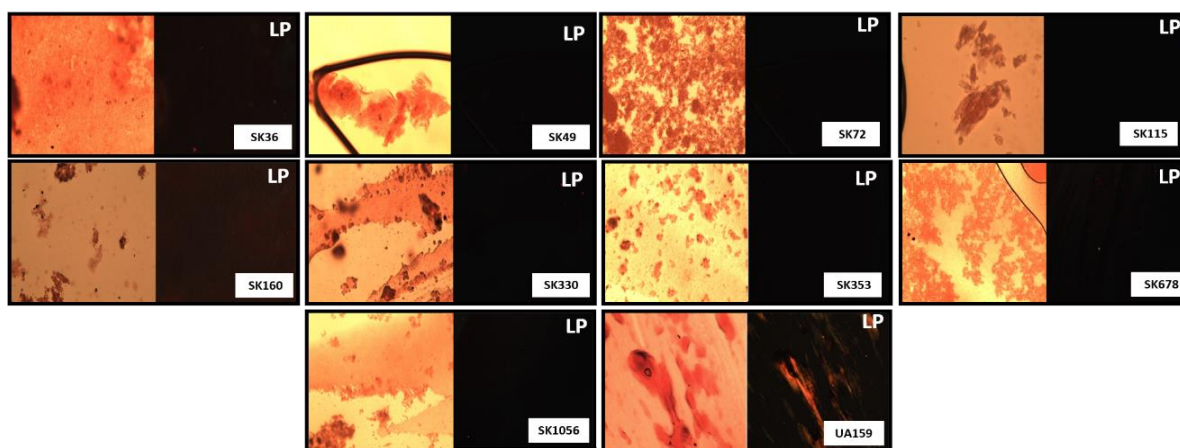


Figura 1: Análise de birrefringência das colônias das cepas de *Streptococcus sanguinis* coradas com vermelho congo (VC). Colônias de cada cepa foram coletadas de culturas em BHI ágar (37°C, 10% CO₂; 18h), transferidas para lâmina de vidro, adicionadas de solução de VC (7,2 mM). A birrefringência foi analisada sob luz polarizada utilizando microscópio com Sistema Fotodocumentação e Luz Polarizada - Leica – DMLP, com o polarizador ajustado em um ângulo de 90° em relação ao analisador. As lâminas contendo as amostras foram visualizadas sob aumento de 100x. Imagens representativas obtidas para cada cepa são mostradas nos respectivos painéis retangulares contendo imagem da obtida sem luz polarizada (à esquerda) e sob luz polarizada cruzada (à direita). A cepa *S. mutans* UA159 foi utilizada como referência. Cada imagem é representativa de colônias obtidas de três culturas independentes obtidas para cada cepa. Leve birrefringência verde foi observada apenas na cepa *S. mutans* UA159.

Por outro lado, os biofilmes de todas as cepas estudadas de *S. sanguinis*, formados *in vitro* em meio BHI acrescido de 1% de sacarose, apresentaram birrefringência com coloração verde (**Figura 2**), indicando assim a produção de amilóide em biofilmes de *S. sanguinis*. É

possível observar que o biofilme produzido pela cepa de referência de *S. mutans* (UA159), é mais espesso e sua biomassa é maior, por isso é observado uma maior birrefringência, quando utilizada a microscopia de luz polarizada. Dentre as cepas de *S. sanguinis*, já foi mostrado a diferença entre a biomassa dos biofilmes formados por essas cepas (Salvatierra, 2019), e essa diferença também é observada nos ensaios de birrefringência. As cepas SK72, SK115, 678 e 1056, apresentaram um campo maior de birrefringência em relação as outras cepas. As cepas SK36 e 49, apresentaram os menores campos de birrefringência em relação as outras cepas.

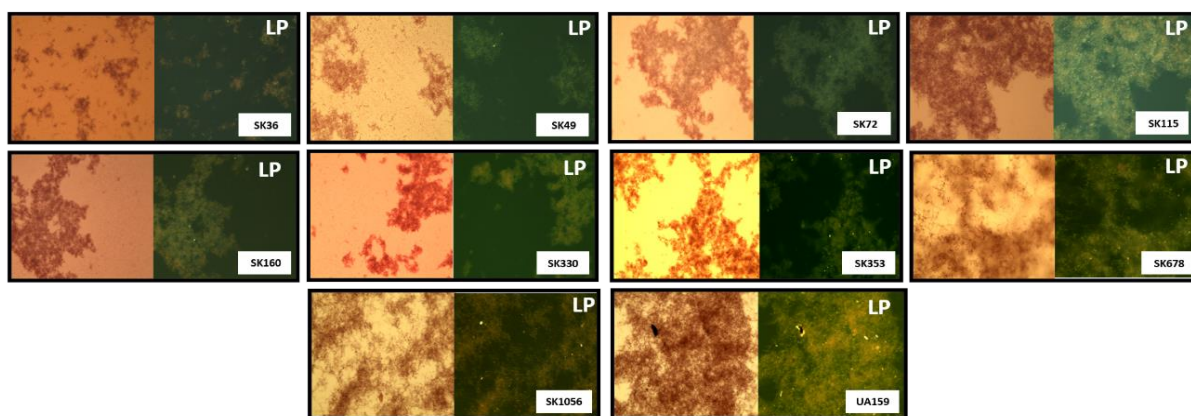


Figura 2: Análise de birrefringência de biofilmes maduros de *S. sanguinis* corados com vermelho congo (VC). Os biofilmes formados em placas de 96 poços em meio BHI suplementado com 1% de sacarose (37°C, sob agitação; 18 h) foram ressuspensos e homogeneizados em solução de VC a uma concentração de 7,2mM por pipetagem. A birrefringência foi analisada sob luz polarizada utilizando microscópio com Sistema Fotodocumentação e Luz Polarizada - Leica – DMLP, com o polarizador ajustado em um ângulo de 90° em relação ao analisador. As lâminas contendo as amostras foram visualizadas sob aumento de 100x. Imagens representativas obtidas para cada cepa são mostradas nos respectivos painéis retangulares contendo imagem obtida sem luz polarizada (à esquerda) e sob luz polarizada cruzada (à direita). A cepa *S. mutans* UA159 foi utilizada como controle positivo. Cada imagem é representativa de imagens analisadas de três culturas independentes.

5.2 Análise da presença de fibras amilóides em sobrenadantes de cultura planctônica através da fluorescência.

5.2.3 Análise de microscopia de confocal de sobrenadantes de cultura concentrados.

Análises de microscopia de confocal foram realizadas em amostras de concentradas de sobrenadante das cepas de *S. sanguinis* submetidas à agitação (48 h) e coradas com TT. A **Figura 3** mostra imagens representativas de amostras obtidas de todas as cepas *S. sanguinis*, revelando agregados TT-fluorescentes indicativos de amilóides. As cepas SK36, SK330, SK353 e SK1056, demonstraram grande formações de agregados TT-fluorescentes, enquanto outras (SK49, SK72, SK115 e SK678), apresentaram agregados menores. Esta análise

qualitativa indicou que diversas cepas *S. sanguinis* são produtoras de amilóide, incluindo-se a cepa SK36, a qual produziu grandes agregados. A cepa de *S. mutans* (UA159) utilizada como referência também mostrou agregados fluorescentes significativos.

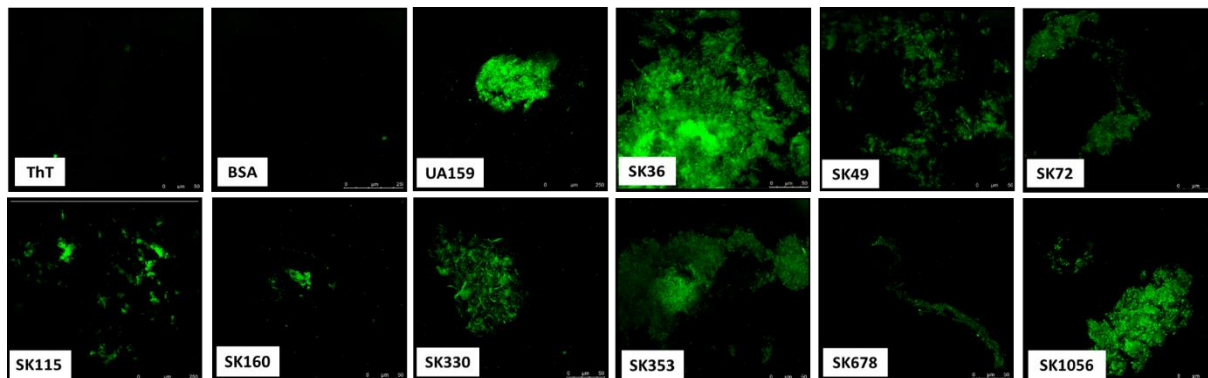


Figura 3: Análise de microscopia confocal para detecção de amilóide em sobrenadantes de cultura de cepas de *S. sanguinis*. As amostras de sobrenadante obtidas de culturas em MQD com $A_{550nm} \sim 1,0$ foram dialisadas, concentradas (100 vezes), ajustadas para uma concentração de $\sim 0,5$ ug/ml de proteína e submetidas a agitação por 48 h ($4^{\circ}C$), para favorecer a formação de amilóide. O corante tioflavina T (TT), foi preparado em um tampão fosfato (10mM NaH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7,0). O TT foi adicionado em 20 μL de amostra para uma concentração final de 2,5 μM e as amostras transferidas para uma lamínula de vidro, para observação em microscópio confocal (LAICA TCS SP5; excitação/emissão: 450/482 nm). Amostras da cepa *S. mutans* UA159 foram utilizadas referência da formação de amilóide. Solução tampão contendo somente TT e amostra de proteína BSA (0,5 ug/ml) corada com TT foram utilizados como controles negativos.

5.2.3 Quantificação de amilóide em sobrenadantes de cultura concentrados obtidos sob diferentes condições por espectrofluorimetria.

As amostras de sobrenadantes das cepas de *S. sanguinis* também foram coradas com TT e analisadas com auxílio de fluorímetro de placas, para comparações quantitativas da produção de amilóide sob diferentes condições de incubação (com agitação versus sem agitação). Dois experimentos independentes puderam ser concluídos (**Figura 4A, B**). Como mostrado na **Figura 4A**, no experimento 1, o processo de agitação por 48 h permitiu a detecção de maior quantidade de amilóide em diversas cepas, particularmente nas cepas SK72, SK115, SK160, SK330, SK678 e SK1056, comparado às amostras da mesma cepa sem agitação ($p < 0,05$). Sob agitação, verificaram-se que as amostras das cepas SK72, SK115, SK160, SK330, SK678 e SK1056 apresentaram quantidades significativamente maiores de amilóide do que a SK36, enquanto as cepas SK49 e SK353 formaram menos amilóides em relação à SK36. Nas amostras sem agitação, as quantidades de amilóide formado sofreram menor variação, embora as análises estatísticas tenham revelado algumas diferenças estatisticamente

significantes em relação à cepa referência SK36 (**Figura 4A**). Os dados do experimento 2 (**Figura 4B**) foram compatíveis com os do experimento 1, com relação à maior produção de amilóide pelas cepas SK72, SK160, SK330 e SK1056, quando comparadas à cepa SK36. Entretanto, estas cepas produziram maior formação de amilóide mesmo em amostras não agitadas (**Figura 4B**). Por outro lado, as quantidades de amilóide formados pelas cepas SK115 mostrou variação em relação ao experimento 1.

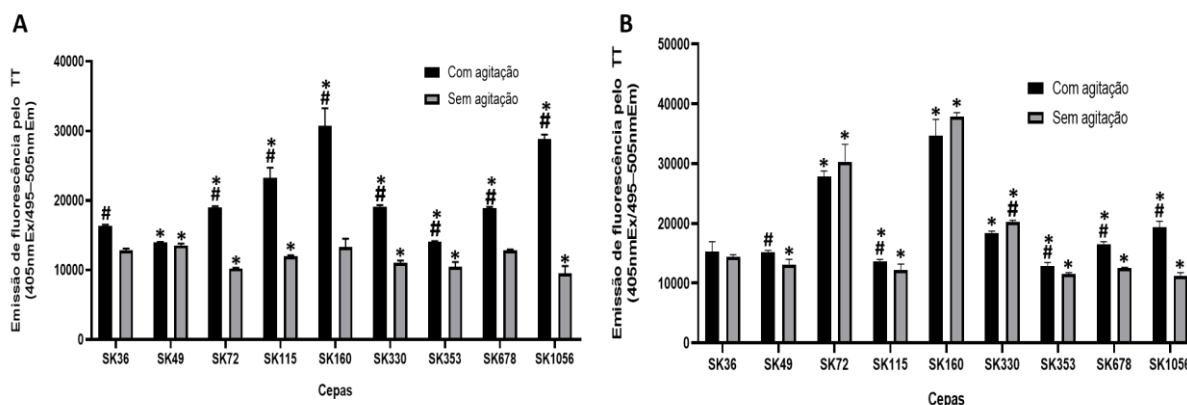


Figura 4: Análise da formação de amilóides em amostras concentradas de sobrenadante de *S. sanguinis*. As amostras de sobrenadante obtidas de culturas em MQD com A550nm ~1,0, foram dialisadas, concentradas (100 vezes) e submetidas ou não a agitação (48 h; 4°C). Volumes destas amostras foram ajustados para concentração de proteína total de ~0,5 mg/ml em tampão fosfato (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0). Amostras de cada grupo foram transferidas em quadruplicata para placas de microtitulação pretas, adicionadas de tioflavina T (TT) a uma concentração final de 2,5µM e analisadas em fluorímetro GloMax® Discover System com o filtro AFC (405nmEx/495–505nmEm). As colunas indicam a médias das quadruplicatas; as barras os desvios padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas na emissão de fluorescência em comparação com a cepa de referência SK36. Os símbolos # indicam diferenças entre as amostras agitadas em relação às amostras não agitadas obtidas da mesma cepa (Mann-Whitney p<0,05). Os gráficos apresentam os resultados de dois experimentos independentes, A e B.

O perfil eletroforético de proteínas de sobrenadantes de cultura de cepas *S. sanguinis* foi realizado para determinar a integridade das proteínas presentes nas amostras. Podemos observar uma diferença de concentração nas amostras das cepas SK72 e SK160, em relação as amostras do experimento 1 (**Figura 5A**). É possível que possa que ter ocorrido um erro de pipetagem ou na quantificação da concentração, feita através do corante Bradford®. Portanto, existe a possibilidade que esse erro tenha sido responsável pela variação nos resultados de quantificação de amilóides em sobrenadantes (**Figura 4A e B**).

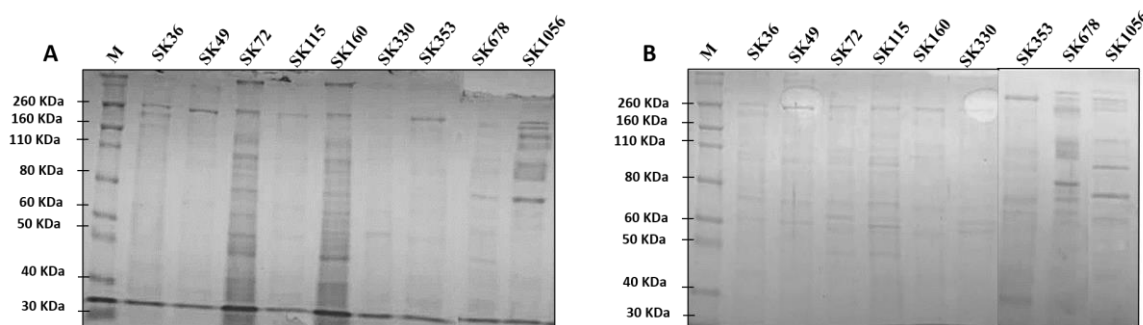


Figura 5: Perfil eletroforético de proteínas de sobrenadantes de cultura de cepas *S. sanguinis*. Amostras de sobrenadante utilizadas para detecção de amilóide foram aplicadas (10 µg de proteína por canaleta) em géis de poliacrilamida SDS-PAGE a 8%, separadas eletroforeticamente e coradas com *Coomassie blue*. As imagens A e B correspondem aos perfis de proteínas dos sobrenadantes de culturas obtidos em dois experimentos independentes. As cepas correspondentes a cada amostra estão indicadas acima das respectivas canaletas. M: Novex® Sharp Protein Standard (Invitrogen LC5800).

5.3 Efeito do EGCG na formação de biofilmes por cepas *S. sanguinis* sob diferentes condições de crescimento.

As cepas de *S. sanguinis* foram comparadas quanto à formação de biofilme *in vitro* (placas de 96 poços) em meio BHI e BHIS acrescidos de 1% de sacarose, na presença ou não do composto EGCG (inibidor da formação de amilóide). Em BHI (**Figura 6A**), ao contrário do esperado, a adição de EGCG promoveu aumentos significativos (de cerca de 5 a 12 vezes maior) na formação de biofilmes em comparação às culturas no mesmo meio não suplementado com EGCG, para diversas cepas (SK49, SK72, SK115, SK160, SK330 e SK1056). Estas diferenças não estiveram relacionadas a variações no crescimento planctônico monitorado paralelamente (**Figura 6C**). A cepa SK36, assim como nas cepas isoladas de sangue (SK678 e SK1056) apresentaram boa formação de biofilmes em ambas as condições (**Figura 6A**). Em BHIS (**Figura 6B**), os resultados foram consistentes com dados obtidos em BHI, exceto para a cepa SK160, a qual mostrou redução de aproximadamente 3 vezes ($p < 0,01$) na formação de biofilme na presença de EGCG. Assim como nos ensaios em BHI, o crescimento planctônico em BHIS foi semelhante entre cepas e entre meios suplementados ou não com EGCG (**Figura 6D**), indicando que EGCG não interfere no crescimento celular nas concentrações utilizadas.

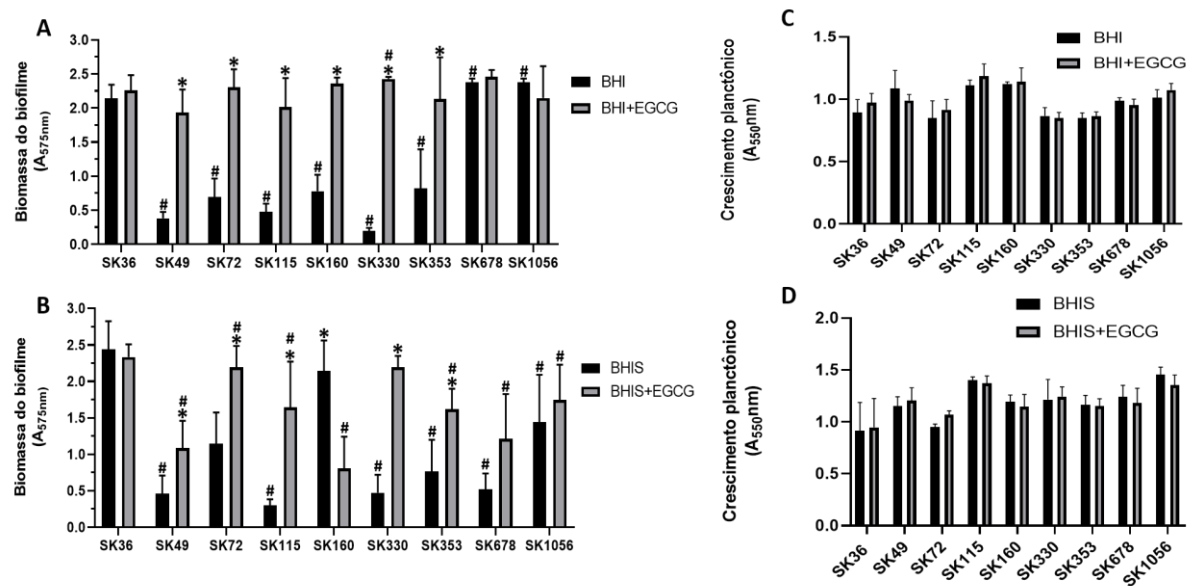


Figura 6: Formação de biofilmes por cepas *S. sanguinis* na presença ou ausência do inibidor da fibrilação de amilóide (EGCG). Biofilmes formados em placas de 96 poços em meios BHI com 1% de sacarose (A) ou BHIS (BHI suplementado com 10% de saliva humana) com 1% de sacarose (B) na presença e ausência de EGCG foram corados com cristal violeta. As absorvâncias (A_{575nm}) do corante eluído foram expressas como medidas indiretas de biomassa dos biofilmes. As colunas representam médias de três experimentos independentes realizados em quadruplicata. As barras indicam os desvios padrão. Asteriscos indicam diferenças significativas em comparação ao controle sem EGCG da mesma cepa; símbolos # indicam diferenças significativas em relação à cepa padrão SK36 na mesma condição (Mann-Whitney $p < 0,01$). O crescimento planctônico das mesmas culturas iniciais foi monitorado paralelamente (C e D, respectivamente). Não foram observadas diferenças de crescimento entre culturas com e sem EGCG (Mann-Whitney $p > 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Devido ao constante contato com o meio externo, a cavidade bucal torna-se a porta de entrada do corpo humano para diversos microrganismos (Silk, 2014). Além disso, possui um microbioma com alta diversidade de microrganismos, como fungos, bactérias, arqueias e vírus (Kilian, 2018). Espécies de *Streptococcus* spp. são abundantes em diversos nichos bucais e muitas destas são colonizadoras pioneiras dos dentes e mucosas (Abranches *et al.*, 2018). *Streptococcus sanguinis* é uma espécie reconhecida como comensal e pioneira das superfícies dentárias, sendo assim muito importante para a formação dos biofilmes dentários (Zhu *et al.*, 2018), os quais são formados por uma matriz extracelular de composição diversificada considerando-se o estágio de formação e a composição microbiana durante os ciclos de formação de biofilmes nas diferentes superfícies. Estas podem incluir diversos exopolímeros, incluindo-se polissacarídeos, DNA, proteínas e fibras amilóides (Karygianni *et al.*, 2020). A composição dessa matriz pode variar dependendo do tipo de microrganismos presente, disponibilidade de nutrientes e ambiente, onde o biofilme se encontra (Flemming *et al.*, 2016).

Fibras amilóides foram detectadas em biofilmes formados por diversas espécies bacterianas, como *Mycobacterium tuberculosis* (Ramsugit *et al.*, 2013), *Staphylococcus aureus* (Schwartz & Boles, 2013), *Legionella pneumophila* (Peterson *et al.*, 2018), incluindo-se *Streptococcus mutans* (Oli *et al.*, 2012; Besingi *et al.*, 2017). Entretanto, as funções de diferentes amilóides na biologia de cada espécie bacteriana são variáveis e precisam ser mais bem compreendidas (Romero & Kolter, 2014; Barnhart *et al.*, 2006; Duehom *et al.*, 2010; Oli *et al.*, 2010; Biesecker *et al.*, 2018).

Diversas técnicas foram descritas para detecção de amilóides *in vitro*, como por exemplo, análises de microscopia de amostras coradas com corantes TT e VC (Nillson, 2004). Apesar da análise de microscopia de luz polarizada de amostras coradas com VC ter limitação quanto à especificidade de detecção de amilóides, essa técnica apresenta diversas vantagens, como rapidez e fácil detecção *in vitro*, por isso é amplamente utilizada (Yakupova *et al.*, 2019). A detecção de amilóides em colônias de *S. mutans* por birrefringência foi descrita anteriormente, utilizando a cepa selvagem NG8 e isolados clínicos 3svf1, 1svf1, 5ST1 e 81D2 (Oli *et al.*, 2012). No nosso trabalho, verificamos birrefringência para colônias da cepa *S. mutans* UA159, porém não foi possível detectar birrefringência nas colônias das cepas de *S. sanguinis*, indicando que na forma de colônias esses microrganismos não apresentam formação significativa de fibras amilóides, pelo menos nas condições de cultivo utilizadas. Recentemente, foi demonstrado a presença de amilóides em biofilmes de *S. mutans* com 60 horas de

crescimento por detecção de birrefringência utilizando o VC (Barran-Berdon *et al.*, 2020), o que indica a produção tardia dessas estruturas. Nos ensaios de formação de biofilmes de *S. sanguinis* com crescimento de 18 horas, em meio BHI acrescidos de 1% de sacarose, foi possível detectar a birrefringência em todas as cepas estudadas, indicando a presença de amilóides em biofilmes de *S. sanguinis*. Porém, é necessária a realização desses experimentos em diversos tempos de crescimento para melhor caracterizar a participação de amilóides nos diferentes estágios de formação de biofilmes por esta espécie.

Um componente importante para a formação dos biofilmes microbianos é a produção de eDNA (Das *et al.*, 2013). O eDNA é um componente essencial na formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (Whitchurch *et al.*, 2002) e *Staphylococcus aureus* (Dengler *et al.*, 2015). Em *S. sanguinis*, a liberação de eDNA está associada à produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido pelo gene *spxB* (Kreth *et al.*, 2018). Uma mutação *knockout* de *vicK* (gene que codifica proteína sensora do sistema de dois componentes VicRK) na cepa SK36, inibiu a produção de H_2O_2 e, assim, a liberação de eDNA resultando em uma diminuição na formação dos biofilmes (Moraes *et al.*, 2014). Em cepas de *Salmonella typhimurium* (Gallo *et al.*, 2016) e *S. aureus* (Schwartz *et al.*, 2016), a presença do eDNA também acelerou a polimerização de amilóides *in vitro*. Como a produção de H_2O_2 em *S. sanguinis* e consequentemente a liberação de eDNA, está associada à condição de aerobiose (Kreth *et al.*, 2009), a não detecção de birrefringência nas colônias das cepas analisadas poderia estar associada a ausência de eDNA liberado na condição de crescimento usada. Diferente de *S. sanguinis*, *S. mutans* produz eDNA por mecanismos distintos de *S. sanguinis*, visto que não produz peróxido de hidrogênio (Liao *et al.*, 2014) e os mecanismos envolvidos na produção de eDNA envolvem genes não identificados na espécie *S. sanguinis* embora também regulados pelo sistema homólogo VicRK (Stipp *et al.*, 2013).

Dentre os métodos de detecção de amilóides, a Tioflavina T é uma sonda fluorescente amplamente utilizada na detecção de fibras amilóides (Naiki *et al.*, 1990). A utilização dessa técnica está associada à detecção de fibras amilóides em diversos microrganismos, como *S. mutans* (Oli *et al.*, 2012), *E. coli* (Bhoite *et al.*, 2019), *Pseudomonas* spp. (Dueholm *et al.*, 2013), incluindo-se análises de microscopia confocal (Ellis *et al.*, 2008) ou utilizando-se leitores de fluorescência em amostras em microplacas (LeVine, 1995). As amostras de sobrenadante obtidas das culturas de *S. sanguinis* do nosso estudo (item 4.6), foram submetidas à agitação por 48 horas para estimular a formação ou polimerização das fibras amilóides e posteriormente analisadas em microscopia de confocal utilizando o corante TT.

Estudos anteriores nas espécies de *S. mutans*, indicam que a agitação estimula a formação de amilóide (Oli *et al.*, 2012; Besingi *et al.*, 2017). As amostras de sobrenadante mostraram a presença de amilóides em todas as cepas estudadas, indicando que a espécie *S. sanguinis* excreta proteínas formadoras de amilóides. A análise dos perfis eletroforéticos das proteínas das amostras testadas, revelou maior concentração de proteínas nas amostras obtidas das cepas SK72 e SK160, indicando necessidade de novos experimentos para confirmar diferenças na secreção de proteínas entre as cepas estudadas (Figura 5A). É possível que as análises de quantificação de proteína não tenham sido suficientes para corrigir estas diferenças no experimento 1. Entretanto, as análises eletroforéticas das amostras analisadas no experimento dois não revelaram diferenças nas concentra e proteínas secretadas (Figura 5B), embora o mesmo padrão de alta produção de amilóide pela cepa SK160 (Figura 4B), indique que esta cepa é alta produtora de proteínas secretadas formadoras de amilóide. Esta cepa poderá ser útil para a identificação das proteínas expressar por *S. sanguinis* capazes de formar fibras amilóides no meio extracelular.

S. sanguinis apresenta um grande número de proteínas associadas à sua superfície (Xu *et al.*, 2007), sendo que uma ou mais podem então estar envolvidas na formação de amilóides nessa espécie. A produção de amilóides pode ocorrer por mecanismos específicos, como bem caracterizado em *E. coli*. Esta espécie produz fibras amilóides curli formadas por duas sub-unidades, CsgA e CsgB (Hammar *et al.*, 1995; Barnhart & Chapman, 2006). Por outro lado, outras espécies podem formar amilóide a partir de proteínas sem características clássicas de sub-unidades de amilóide, que poderiam sofrer polimerização sob certas condições ambientais, como é o caso do *S. mutans* cuja formação de amilóide parece envolver a polimerização da adesina P1 (Oli *et al.*, 2012). O mesmo também ocorre em *S. aureus* a partir da proteína Bap (Taglialegna *et al.*, 2016), por isso é necessário investigar quais proteínas excretadas pelos *S. sanguinis* podem ser responsáveis pela formação de amilóides.

Os ensaios de fluorimetria de amostras de sobrenadante coradas com TT mostraram que a produção de amilóides é cepa-dependente, apontando uma variação entre as cepas estudadas quando comparadas com a cepa padrão SK36. Também foi possível observar variações nas concentrações de amilóides em amostras submetidas a agitação por 48 h quando comparadas a amostras sem agitação. A influência na agitação na formação de amilóide havia sido descrita em cepas de *S. mutans* (Oli *et al.*, 2012; Besingi *et al.*, 2017). Isso ocorre, pois a agitação parece estimular o início da cinética de nucleação-polimerização das fibras amilóides a qual facilitaria a posterior adição de monômeros, resultando assim na formação das fibras

amilóides (Nilsson, 2004). Outros fatores também podem influenciar na formação de amilóides de forma direta ou indireta. Em cepas de *E. coli*, a formação de fibras *curli* ocorre através da transcrição de dois operons, *csgDEFG* e *csgBAC* (Hammar *et al.*, 1995). O operon *csgBA* codifica as proteínas CsgA e CsgB, sendo a principal subunidade estrutural e a proteína nucleadora respectivamente, enquanto o operon *csgDEFG* é responsável pela produção de quatro proteínas necessárias na polimerização das fibras *curli* (Hammar *et al.*, 1995). A proteína CsgD atua como *regulador* transcricional positivo do operon *csgDEFG* (Brombacher *et al.*, 2006). A lipoproteína CsgG é encontrada ancorada na membrana externa sendo responsável por fornecer estabilidade para a fibra *curli* (Hammar *et al.*, 1997). Pouco se sabe sobre a função das proteínas CsgE e CsgF, porém estão associadas a maquinaria de polimerização das fibras *curli*, atuando semelhantes a chaperonas e nucleadoras (Brombacher *et al.*, 2006). Além disso, a produção dessas amilóides podem depender de diversas condições ambientais e fisiológicas, como temperatura, osmolaridade e condições de crescimento (Olsén *et al.*, 1993). Em *S. mutans*, a formação de amilóides também pode sofrer interferências de fatores externos, como pH e temperatura, assim como a presença de compostos como eDNA (Chen *et al.*, 2019). Todos esses fatores, podem contribuir para as diferenças observadas entre as cepas de *S. sanguinis* estudadas. Estudos anteriores do nosso grupo revelaram diversidade na liberação de eDNA entre essas mesmas cepas de *S. sanguinis* (Salvatierra, 2019).

Os biofilmes são encontrados em quase todos os ambientes naturais ou artificiais (Erskine *et al.*, 2018), e os amilóides funcionais, como são descritas essas estruturas produzidas pelos microrganismos, vem sido descritas em biofilmes de diversos tipos de microrganismos (Besingi *et al.*, 2017). Acredita-se que cerca de 40% dos microrganismos produzam fibras amilóides (Otzen & Nilsen, 2008). Os microrganismos em biofilmes apresentam maior resistência aos antibióticos e a fatores imunológicos do hospedeiro, sendo essas comunidades responsáveis por cerca de 80% das infecções bacterianas no corpo (Worthington *et al.*, 2013). *S. sanguinis* está envolvida na patogênese de endocardites bacterianas, uma infecção das válvulas cardíacas e/ou endocárdio (Cahill & Prendergast, 2016).

O EGCG tem se mostrado um agente importante no controle de biofilmes, tendo como alvo as fibras amilóides que compõem a matriz extracelular (Hengge, 2019). Esse composto, quando aplicado ao meio de cultura, inibiu a formação de fibras amilóides *curli* em *E. coli*, reduzindo assim a formação de biofilme. Outros compostos, também presentes no chá verde, como o ECG (epicatequina galato), demonstraram capacidade de inibir a formação de biofilmes. O composto EC (epicatequina) não demonstrou interferência na formação dos

biofilmes, assim como EGC (epigallocatequina), o que indica que a porção galato do EGCG e o ECG são as porções mais ativas na inibição da polimerização de fibras amilóides nas cepas de *E. coli* (K-12 W3110) estudadas (Serra *et al.*, 2016). O EGCG também demonstrou ação anti-biofilme em *Enterococcus faecalis* (Lee & Tan, 2015), em *S. aureus* (Taglialegna *et al.*, 2016) e em *S. mutans* (Oli *et al.*, 2012).

Como a detecção de amilóides em biofilmes maduros de *S. sanguinis* através da técnica de birrefringência foi positiva, a ação do EGCG nesses biofilmes foi testada sob duas condições de crescimento, em BHI e BHIS, ambos acrescidos de 1% de sacarose. Ao contrário do esperado, a presença de EGCG não inibiu a formação de biofilmes nas cepas de *S. sanguinis*. Na cepa padrão SK36 não foi observada nenhuma alteração na biomassa em ambas as condições testadas, assim como nas cepas isoladas da corrente sanguínea SK678 e SK1056. Estes resultados sugerem que o EGCG não foi capaz de inibir a formação de amilóides nas condições testadas, ou que a contribuição de amilóide para a maturação de biofilmes não foi significativa para a fase de formação de biofilme estudada. As cepas SK49, SK72, SK115, SK330 e SK353, apresentaram um aumento na biomassa dos biofilmes na presença de EGCG. Apenas a cepa SK160 na condição de BHIS demonstrou uma redução na biomassa do biofilme na presença de EGCG, como foi observado em estudos anteriores (Oli *et al.*, 2012), porém só foi observado esse resultado quando o meio de cultura foi suplementado com saliva humana. Estes dados sugerem que os componentes salivares também apresentam a capacidade de modular a formação do biofilme em associação com o EGCG. Os resultados nos biofilmes na ausência de EGCG corroboram os resultados obtidos em pesquisas realizadas anteriormente pela nossa equipe utilizando as mesmas cepas (Salvatierra, 2019). É importante ressaltar que esses resultados foram reprodutíveis em 4 experimentos independentes.

A incubação paralela das culturas planctônicas utilizadas nos ensaios de biofilme demonstrou que o EGCG não teve influência no crescimento planctônico das cepas, o que demonstra que as diferenças apresentadas nos ensaios são específicas para a formação de biofilmes na presença deste composto. Diversos fármacos antimicrobianos, quando utilizados com concentrações sub-inibitórias, são capazes de estimular a formação de biofilmes. Cepas de *E. coli* quando expostas a concentrações sub-inibitórias (sub-MIC) de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, demonstram aumento na formação de biofilmes (Boehm *et al.*, 2009), assim como o tratamento de *S. aureus* com cefalexina também promove o aumento na formação de biofilmes em concentrações de sub-MIC (Haddadin *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram observados também em cepas de *Streptococcus epidermidis* (Schadow *et al.*, 1988), *P.*

aeruginosa (Linares *et al.*, 2006) e *Streptococcus intermedius* (Ahmed *et al.*, 2009), quando tratadas com diferentes antimicrobianos. Portanto, o aumento na biomassa de biofilmes formados por cepas *S. sanguinis* poderiam ser explicadas pela concentração do composto EGCG utilizada. Como mencionado anteriormente, os biofilmes consistem numa forma de resistência microbiana a diferentes estresses, portanto a presença do EGCG pode ter estimulado diferentes mecanismos para o aumento da biomassa de biofilmes.

O aumento na biomassa de biofilmes em resposta a fármacos antimicrobianos está também associado ao aumento ou diminuição da expressão de diversos genes envolvidos neste processo. Ensaio com *P. aeruginosa* demonstraram o aumento na formação de biofilmes, quando tratadas com concentrações sub-MIC de antibióticos, está associada à alterações na expressão de diversos genes, como verificado em análises de *microarray GeneChip*, com aumento na expressão de genes envolvidos na formação dos biofilmes (Bagge *et al.*, 2004). O mesmo foi verificado em cepas de *Salmonella typhimurium* (Goh *et al.*, 2002). O tratamento com polifenóis e com outros agentes antimicrobianos (como a clorexidina) em concentrações sub-MIC, promove regulação positiva na expressão de genes implicado na formação de biofilmes em cepas *S. mutans* (Dong *et al.*, 2012). Porém, o tratamento com polifenóis nessas concentrações, não promoveu formação de biofilmes (Dong *et al.*, 2012). Esses resultados indicam que substâncias antimicrobianas podem influenciar de formas distintas a formação de biofilmes. Assim, se faz necessário avaliar o efeito do EGCG na expressão de genes envolvidos na regulação e em funções de formação de biofilmes previamente identificados (Moraes *et al.*, 2014; Camargo *et al.*, 2018), nas cepas *S. sanguinis* estudadas. Estes estudos serão necessários para elucidar os mecanismos envolvidos no efeito de EGCG na formação de biofilmes pelas cepas estudadas, contribuindo para a melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes pela espécie *S. sanguinis*.

7 CONCLUSÕES

7.1 Todas as cepas *S. sanguinis* estudadas produzem polímeros característicos de amilóides em biofilmes, segundo parâmetros de birrefringência, embora estes polímeros não sejam detectados em colônias desenvolvidas em meio sólido de cultivo.

7.2 Fibras amilóides podem ser detectas em sobrenadantes de cultura em MQD das cepas *S. sanguinis* estudadas, utilizando-se o corante TT, embora haja variações significativas na quantidade destes polímeros entre cepas.

7.3 O efeito do EGCG na formação de biofilmes por *S. sanguinis* é cepa-dependente, sendo que a presença deste composto pode estar associada com o aumento ou diminuição da biomassa de biofilmes formados.

8 REFERÊNCIAS

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721–5732. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>
- Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S. R., Chakraborty, B., Wen, Z. T., Richards, V. P., Brady, L. J., & Lemos, J. A. (2018). Biology of Oral Streptococci. *Microbiology Spectrum*, 6(5), 1–12. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0042-2018>
- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., Gamonal, J., & Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME Journal*, 7(5), 1016–1025. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.174>
- Alteri, C. J., Xicohténcatl-Cortes, J., Hess, S., Caballero-Olin, G., Girón, J. A., & Friedman, R. L. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* produces pili during human infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 5145–5150. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602304104>
- Alturkistani, H. A., Tashkandi, F. M., & Mohammedsaleh, Z. M. (2015). Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science*, 8(3), 72–79. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v8n3p72>
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2010). Plaque Assay for Detecting Lysogeny. *Annual Review of Microbiology*, 60, 131–147. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142106>
- Barran-Berdon, A. L., Ocampo, S., Haider, M., Morales-Aparicio, J., Ottenberg, G., Kendall, A., Yarmola, E., Mishra, S., Long, J. R., Hagen, S. J., Stubbs, G., & Brady, L. J. (2020). Enhanced purification coupled with biophysical analyses shows cross- β structure as a core building block for *Streptococcus mutans* functional amyloids. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62115-7>
- Bastianetto, S., Krantic, S., & Quirion, R. (2008). Polyphenols as Potential Inhibitors of Amyloid Aggregation and Toxicity: Possible Significance to Alzheimer's Disease. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8(5), 429–435. <https://doi.org/10.2174/138955708784223512>

- Belda-Ferre, P., Alcaraz, L. D., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, A., Pignatelli, M., & Mira, A. (2012). The oral metagenome in health and disease. *ISME Journal*, 6(1), 46–56. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.85>
- Berger, D., Rakhamimova, A., Pollack, A., & Loewy, Z. (2018). Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High-Throughput*, 7(3), 1–8. <https://doi.org/10.3390/ht7030024>
- Besingi, R. N., Wenderska, I. B., Senadheera, D. B., Cvitkovitch, D. G., Long, J. R., Wen, Z. T., & Brady, L. J. (2017). Functional amyloids in streptococcus mutans, their use as targets of biofilm inhibition and initial characterization of SMU_63c. *Microbiology (United Kingdom)*, 163(4), 488–501. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000443>
- Bhoite, S., van Gerven, N., Chapman, M. R., & Remaut, H. (2019). Curli Biogenesis: Bacterial Amyloid Assembly by the Type VIII Secretion Pathway. *Protein Secretion in Bacteria*, 163–171. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0037-2018>
- Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804(7), 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>
- Blanco, L. P., Evans, M. L., Smith, D. R., Badtke, M. P., & Chapman, M. R. (2012). Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends in Microbiology*, 20(2), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.11.005>
- Brady, L. J., Maddocks, S. E., Larson, M. R., Forsgren, N., Persson, K., Deivanayagam, C. C., & Jenkinson, H. F. (2010). The changing faces of Streptococcus antigen I/II polypeptide family adhesins: MicroReview. *Molecular Microbiology*, 77(2), 276–286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07212.x>
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C., & Landini, P. (2006). Gene expression regulation by the curli activator CsgD protein: Modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *Journal of Bacteriology*, 188(6), 2027–2037. <https://doi.org/10.1128/JB.188.6.2027-2037.2006>
- Buell, A. K., Galvagnion, C., Gaspar, R., Sparr, E., Vendruscolo, M., Knowles, T. P. J., Linse, S., & Dobson, C. M. (2014). Solution conditions determine the relative importance of nucleation and growth processes in α -synuclein aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(21), 7671–7676. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315346111>

- Cahill, T. J., & Prendergast, B. D. (2016). Infective endocarditis. *The Lancet*, 387(10021), 882–893. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00067-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00067-7)
- Camargo, T. M., Stipp, R. N., Alves, L. A., Harth-Chu, E. N., Höfling, J. F., & Mattos-Graner, R. O. (2018). Novel two-component system of *Streptococcus sanguinis* affecting functions associated with viability in saliva and biofilm formation. *Infection and Immunity*, 86(4), 1–19. <https://doi.org/10.1128/IAI.00942-17>
- Caufield, P. W., Dasanayake, A. P., Li, Y., Pan, Y., Hsu, J., & Hardin, J. M. (2000). Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: Evidence for a discrete window of infectivity. *Infection and Immunity*, 68(7), 4018–4023. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4018-4023.2000>
- Chen, D., Cao, Y., Yu, L., Tao, Y., Zhou, Y., Zhi, Q., & Lin, H. (2019). Characteristics and influencing factors of amyloid fibers in *S. mutans* biofilm. *AMB Express*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0753-1>
- Cucarella, C., Tormo, M. Á., Knecht, E., Amorena, B., Lasa, Í., Foster, T. J., & Penadés, J. R. (2002). Expression of the biofilm-associated protein interferes with host protein receptors of *Staphylococcus aureus* and alters the infective process. *Infection and Immunity*, 70(6), 3180–3186. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.3180-3186.2002>
- Dengler, V., Foulston, L., DeFrancesco, A. S., & Losick, R. (2015). An electrostatic net model for the role of extracellular DNA in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 197(24), 3779–3787. <https://doi.org/10.1128/JB.00726-15>
- DePas, W. H., & Chapman, M. R. (2012). Microbial manipulation of the amyloid fold. *Research in Microbiology*, 163(9–10), 592–606. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.10.009>
- Diaz, P. I., Chalmers, N. I., Rickard, A. H., Kong, C., Milburn, C. L., Palmer, R. J., & Kolenbrander, P. E. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2837–2848. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2837-2848.2006>
- Dong, L., Tong, Z., Linghu, D., Lin, Y., Tao, R., Liu, J., Tian, Y., & Ni, L. (2012). Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(5), 390–395. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.009>

- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Dueholm, M. S., Søndergaard, M. T., Nilsson, M., Christiansen, G., Stensballe, A., Overgaard, M. T., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Otzen, D. E., & Nielsen, P. H. (2013). Expression of Fap amyloids in *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, and *P. putida* results in aggregation and increased biofilm formation. *MicrobiologyOpen*, 2(3), 365–382. <https://doi.org/10.1002/mbo3.81>
- Dzwolak, W., & Pecul, M. (2005). Chiral bias of amyloid fibrils revealed by the twisted conformation of Thioflavin T: An induced circular dichroism/DFT study. *FEBS Letters*, 579(29), 6601–6603. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.10.048>
- Ehrnhoefer, D. E., Duennwald, M., Markovic, P., Wacker, J. L., Engemann, S., Roark, M., Legleiter, J., Marsh, J. L., Thompson, L. M., Lindquist, S., Muchowski, P. J., & Wanker, E. E. (2006). Green tea (-)-epigallocatechin-gallate modulates early events in huntingtin misfolding and reduces toxicity in Huntington's disease models. *Human Molecular Genetics*, 15(18), 2743–2751. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl210>
- Ellis, B., Brignola, P., Brashear, R. L., Thomas, R., Dickerson, S. H., Dickson, H. D., Kelly, H., Gaul, M., Griffin, R. J., Hassell, A. M., Keith, B., Mullin, R., Petrov, K. G., Reno, M. J., Rusnak, D. W., Tadepalli, S. M., Ulrich, J. C., Craig, D., Vanderwall, D. E., ... Rinaldi, R. (2008). Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils. 105(16).
- Erskine, E., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2018). Functional Amyloid and Other Protein Fibers in the Biofilm Matrix. *Journal of Molecular Biology*, 430(20), 3642–3656. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.07.026>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Francavilla, R., Ercolini, D., Piccolo, M., Vannini, L., Siragusa, S., De Filippis, F., De Pasquale, I., Di Cagno, R., Di Toma, M., Gozzi, G., Serrazanetti, D. I., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2014). Salivary microbiota and metabolome associated with celiac disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11), 3416–3425. <https://doi.org/10.1128/AEM.00362-14>

- Franko, A., Rodriguez Camargo, D. C., Böddrich, A., Garg, D., Rodriguez Camargo, A., Rathkolb, B., Janik, D., Aichler, M., Feuchtinger, A., Neff, F., Fuchs, H., Wanker, E. E., Reif, B., Häring, H. U., Peter, A., & Hrabě De Angelis, M. (2018). Epigallocatechin gallate (EGCG) reduces the intensity of pancreatic amyloid fibrils in human islet amyloid polypeptide (hIAPP) transgenic mice. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18807-8>
- Gallo, P. M., Rapsinski, G. J., Wilson, R. P., Oppong, G. O., Goulain, M., Buttaro, B., Caricchio, R., & Gallucci, S. (2016). HHS Public Access. 42(6), 1171–1184. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.002>. Amyloid-DNA
- Gazit, E. (2005). Mechanisms of amyloid fibril self-assembly and inhibition: Model short peptides as a key research tool. *FEBS Journal*, 272(23), 5971–5978. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05022.x>
- Gerven, N. Van, Klein, R., Hultgren, S., Remaut, H., Biology, S., Brussels, B., & Brussel, V. U. (2016). HHS Public Access. 23(11), 693–706. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.010>. Bacterial
- Goh, E. B., Yim, G., Tsui, W., McClure, J. A., Surette, M. G., & Davies, J. (2002). Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), 17025–17030. <https://doi.org/10.1073/pnas.252607699>
- Haddadin, R. N. S., Saleh, S., Al-Adham, I. S. I., Buultjens, T. E. J., & Collier, P. J. (2010). The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1281–1291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04529.x>
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsén, A., & Normark, S. (1995). Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 18(4), 661–670. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18040661.x
- Harth-Chu, E. N., Alves, L. A., Theobaldo, J. D., Salomão, M. F., Höfling, J. F., King, W. F., Smith, D. J., & Mattos-Graner, R. O. (2019). PcsB Expression Diversity Influences on *Streptococcus mitis* Phenotypes Associated With Host Persistence and Virulence. *Frontiers in Microbiology*, 10(November). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02567>

- Hengge, R. (2019). Targeting bacterial biofilms by the green tea polyphenol EGCG. *Molecules*, 24(13), 15–17. <https://doi.org/10.3390/molecules24132403>
- Hintao, J., Teanpaisan, R., Chongsuvivatwong, V., Ratarasan, C., & Dahlen, G. (2007). The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(3), 175–181. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00341.x>
- Howie, A. J., & Brewer, D. B. (2009). Optical properties of amyloid stained by Congo red: History and mechanisms. *Micron*, 40(3), 285–301. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.10.002>
- Howie, A. J., & Owen-Casey, M. P. (2010). Discrepancies between descriptions and illustrations of colours in Congo red-stained amyloid, and explanation of discrepant colours. *Amyloid*, 17(3–4), 109–117. <https://doi.org/10.3109/13506129.2010.527448>
- Hung, H. Te, Ye, D. Q., & Lai, C. H. (2016). Comparison of the adhesion of *Streptococcus sanguinis* to commonly used dental alloys stratified by gold content. *Journal of Dental Sciences*, 11(4), 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2016.07.005>
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>
- Khurana, R., Coleman, C., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Krishna, V., Grover, R. K., Roy, R., & Singh, S. (2005). Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *Journal of Structural Biology*, 151(3), 229–238. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2005.06.006>
- Kilian, M. (2018). The oral microbiome – friend or foe? *European Journal of Oral Sciences*, 126, 5–12. <https://doi.org/10.1111/eos.12527>
- Kilian, M., Reinholdt, J., Lomholt, H., Poulsen, K., & Frandsen, E. V. G. (1996). Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: Critical evaluation of experimental evidence. *Apmis*, 104(5), 321–338. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1996.tb00724.x>
- Kobayashi, H., Murata, M., Kawanishi, S., & Oikawa, S. (2020). Polyphenols with anti-amyloid β aggregation show potential risk of toxicity via pro-oxidant properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10). <https://doi.org/10.3390/ijms21103561>

- Kopec, L. K., Vacca Smith, A. M., Wunder, D., Ng-Evans, L., & Bowen, W. H. (2001). Properties of *Streptococcus sanguinis* Glucans Formed under Various Conditions. *Caries Research*, 35(1), 67–74. <https://doi.org/10.1159/000047434>
- Kreth, J., Giacaman, R. A., Raghavan, R., Merritt, J., & Health, O. (2018). with *Streptococcus sanguinis*. 32(3), 181–196. <https://doi.org/10.1111/omi.12170>.The
- Kreth, J., Vu, H., Zhang, Y., & Herzberg, M. C. (2009). Characterization of hydrogen peroxide-induced DNA release by *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii*. *Journal of Bacteriology*, 191(20), 6281–6291. <https://doi.org/10.1128/JB.00906-09>
- Kyle, R. A. (2001). Amyloidosis: A convoluted story. *British Journal of Haematology*, 114(3), 529–538. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02999.x>
- Larsen, P., Nielsen, J. L., Dueholm, M. S., Wetzel, R., Otzen, D., & Nielsen, P. H. (2007). Amyloid adhesins are abundant in natural biofilms. *Environmental Microbiology*, 9(12), 3077–3090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01418.x>
- Lee, Y. H., Zimmerman, J. N., Custodio, W., Xiao, Y., Basiri, T., Hatibovic-Kofman, S., & Siqueira, W. L. (2013). Proteomic Evaluation of Acquired Enamel Pellicle during In Vivo Formation. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067919>
- Levine, H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*, 2(3), 404–410. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020312>
- Liao, S., Klein, M. I., Heim, K. P., Fan, Y., Bitoun, J. P., Ahn, S. J., Burne, R. A., Koo, H., Brady, L. J., & Wen, Z. T. (2014). *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *Journal of Bacteriology*, 196(13), 2355–2366. <https://doi.org/10.1128/JB.01493-14>
- Linares, J. F., Gustafsson, I., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2006). Antibiotics as intermicrobiol signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(51), 19484–19489. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608949103>

- Loo, C. Y., Corliss, D. A., & Ganeshkumar, N. (2000). *Streptococcus gordonii* biofilm formation: Identification of genes that code for biofilm phenotypes. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1374–1382. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1374-1382.2000>
- Marsh, S. E., & Blurton-Jones, M. (2012). Examining the mechanisms that link β -amyloid and α -synuclein pathologies. *Alzheimer's Research and Therapy*, 4(2), 1–8. <https://doi.org/10.1186/alzrt109>
- Moore, B., Drolle, E., Attwood, S. J., Simons, J., & Leonenko, Z. (2011). Effect of surfaces on amyloid fibril formation. *PLoS ONE*, 6(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025954>
- Moraes, J. J., Stipp, R. N., Harth-Chu, E. N., Camargo, T. M., Höfling, J. F., & Mattos-Graner, R. O. (2014). Two-component system VicRK regulates functions associated with establishment of *Streptococcus sanguinis* in biofilms. *Infection and Immunity*, 82(12), 4941–4951. <https://doi.org/10.1128/IAI.01850-14>
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., & Foster, K. R. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1), 206–224. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00150.x>
- Naiki, H., Higuchi, K., Matsushima, K., Shimada, A., Chen, W. H., Hosokawa, M., & Takeda, T. (1990). Methods in laboratory investigation. Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis: Use of the fluorescent indicator, Thioflavine T. *Laboratory Investigation*, 62(6), 768–773.
- Nilsson, M. R. (2004). Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34(1), 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.03.012>
- Okshevsky, M., Regina, V. R., & Meyer, R. L. (2015). Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.12.002>
- Oli, M. W., Otoo, H. N., Crowley, P. J., Heim, K. P., Nascimento, M. M., Ramsook, C. B., Lipke, P. N., & Brady, L. J. (2012). Functional amyloid formation by *Streptococcus* mutants. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(12), 2903–2916. <https://doi.org/10.1099/mic.0.060855-0>
- Olsén, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S., & Normark, S. (1993). The RpoS Sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of

fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 7(4), 523–536. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01143.x>

Ono, K., Hasegawa, K., Yoshiike, Y., Takashima, A., Yamada, M., & Naiki, H. (2002). Nordihydroguaiaretic acid potently breaks down pre-formed Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 81(3), 434–440. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00904.x>

Otzen, D. (2010). Functional amyloid: Turning swords into plowshares. *Prion*, 4(4), 256–264. <https://doi.org/10.4161/pri.4.4.13676>

Peterson, C. P., Sauer, C., & Chatfield, C. H. (2018). The Extracellular Polymeric Substances of *Legionella pneumophila* Biofilms Contain Amyloid Structures. *Current Microbiology*, 75(6), 736–744. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1440-1>

Phan, H. T. T., Samarat, K., Takamur, Y., Azo-Oussou, A. F., Nakazono, Y., & Vestergaard, M. C. (2019). Polyphenols modulate alzheimer's amyloid beta aggregation in a structure-dependent manner. *Nutrients*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/nu11040756>

Porat, Y., Abramowitz, A., & Gazit, E. (2006). Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: Structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chemical Biology and Drug Design*, 67(1), 27–37. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2005.00318.x>

Ramos-Montañez, S., Tsui, H. C. T., Wayne, K. J., Morris, J. L., Peters, L. E., Zhang, F., Kazmierczak, K. M., Sham, L. T., & Winkler, M. E. (2008). Polymorphism and regulation of the *spxB* (pyruvate oxidase) virulence factor gene by a CBS-HotDog domain protein (SpxR) in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 67(4), 729–746. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06082.x>

Ramsook, C. B., Tan, C., Garcia, M. C., Fung, R., Soybelman, G., Henry, R., Litewka, A., O'Meally, S., Otoo, H. N., Khalaf, R. A., Dranginis, A. M., Gaur, N. K., Klotz, S. A., Rauceo, J. M., Jue, C. K., & Lipke, P. N. (2010). Yeast cell adhesion molecules have functional amyloid-forming sequences. *Eukaryotic Cell*, 9(3), 393–404. <https://doi.org/10.1128/EC.00068-09>

Ramsugit, S., Guma, S., Pillay, B., Jain, P., Larsen, M. H., Danaviah, S., & Pillay, M. (2013). Pili contribute to biofilm formation in vitro in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 104(5), 725–735. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9981-6>

- Redanz, S., Cheng, X., Giacaman, R. A., Pfeifer, C. S., Merritt, J., & Kreth, J. (2018). Live and let die: Hydrogen peroxide production by the commensal flora and its role in maintaining a symbiotic microbiome. *Molecular Oral Microbiology*, 33(5), 337–352. <https://doi.org/10.1111/omi.12231>
- Reichhardt, C., Jacobson, A. N., Maher, M. C., Uang, J., McCrate, O. A., Eckart, M., & Cegelski, L. (2015). Congo red interactions with curli-producing *E. coli* and native curli amyloid fibers. *PLoS ONE*, 10(10), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140388>
- Romero, D., & Kolter, R. (2014). Functional amyloids in bacteria. *International Microbiology*, 17(2), 65–73. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.208>
- Sachse, C., Xu, C., Wieligmann, K., Diekmann, S., Grigorieff, N., & Fändrich, M. (2006). Quaternary Structure of a Mature Amyloid Fibril from Alzheimer's A β (1-40) Peptide. *Journal of Molecular Biology*, 362(2), 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.011>
- Schadow, K. H., Simpson, W. A., Christensen, G. D., & Christensen, G. D. (1988). Characteristics of adherence to plastic tissue culture plates of coagulase-negative staphylococci exposed to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Journal of Infectious Diseases*, 157(1), 71–77. <https://doi.org/10.1093/infdis/157.1.71>
- Schwartz, K., & Boles, B. R. (2013). Microbial amyloids - functions and interactions within the host. *Current Opinion in Microbiology*, 16(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.12.001>
- Seoudi, N., Bergmeier, L. A., Drobniewski, F., Paster, B., & Fortune, F. (2015). The oral mucosal and salivary microbial community of behçet's syndrome and recurrent aphthous stomatitis. *Journal of Oral Microbiology*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.3402/jom.v7.27150>
- Serra, D. O., Mika, F., Richter, A. M., & Hengge, R. (2016). The green tea polyphenol EGCG inhibits *E. coli* biofilm formation by impairing amyloid curli fibre assembly and downregulating the biofilm regulator CsgD via the σ E-dependent sRNA RybB. *Molecular Microbiology*, 101(1), 136–151. <https://doi.org/10.1111/mmi.13379>
- Silk, H. (2014). Diseases of the mouth. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 41(1), 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2013.10.011>
- Steensma, D. P. (2001). “Congo” red: out of Africa? *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 125(2), 250–252. [https://doi.org/10.1043/0003-9985\(2001\)125<0250:CR>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/0003-9985(2001)125<0250:CR>2.0.CO;2)

- Stipp, R. N., Boisvert, H., Smith, D. J., Höfling, J. F., Duncan, M. J., & Mattos-Graner, R. O. (2013). CovR and VicRK Regulate Cell Surface Biogenesis Genes Required for Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058271>
- Sulatskaya, A. I., Lavysh, A. V., Maskevich, A. A., Kuznetsova, I. M., & Turoverov, K. K. (2017). Thioflavin T fluoresces as excimer in highly concentrated aqueous solutions and as monomer being incorporated in amyloid fibrils. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02237-7>
- Taglialegna, A., Lasa, I., & Valle, J. (2016). Amyloid structures as biofilm matrix scaffolds. *Journal of Bacteriology*, 198(19), 2579–2588. <https://doi.org/10.1128/JB.00122-16>
- Taglialegna, A., Navarro, S., Ventura, S., Garnett, J. A., Matthews, S., Penades, J. R., Lasa, I., & Valle, J. (2016). Staphylococcal Bap Proteins Build Amyloid Scaffold Biofilm Matrices in Response to Environmental Signals. *PLoS Pathogens*, 12(6), 1–34. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005711>
- Tanskanen, M. (1881). Title : “ Amyloid ” — Historical Aspects. 1838, 3–24.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., & Mattick, J. S. (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295(5559), 1487. <https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>
- Wobst, H. J., Sharma, A., Diamond, M. I., Wanker, E. E., & Bieschke, J. (2015). The green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate prevents the aggregation of tau protein into toxic oligomers at substoichiometric ratios. *FEBS Letters*, 589(1), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.026>
- Worthington, R. J., Richards, J. J., & Melander, C. (2013). NIH Public Access. 10(37), 7457–7474. <https://doi.org/10.1039/c2ob25835h.Small>
- Xu, P., Alves, J. M., Kitten, T., Brown, A., Chen, Z., Ozaki, L. S., Manque, P., Ge, X., Serrano, M. G., Puiu, D., Hendricks, S., Wang, Y., Chaplin, M. D., Akan, D., Paik, S., Peterson, D. L., Macrina, F. L., & Buck, G. A. (2007). Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3166–3175. <https://doi.org/10.1128/JB.01808-06>

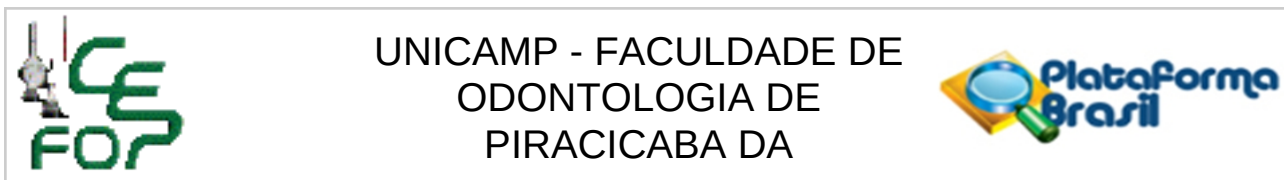
Yakupova, E. I., Bobyleva, L. G., Vikhlyantsev, I. M., & Bobylev, A. G. (2019). Congo Red and amyloids: History and relationship. *Bioscience Reports*, 39(1). <https://doi.org/10.1042/BSR20181415>

Yoshida, Y., Konno, H., Nagano, K., Abiko, Y., Nakamura, Y., Tanaka, Y., & Yoshimura, F. (2014). The influence of a glucosyltransferase, encoded by *gtfP*, on biofilm formation by *Streptococcus sanguinis* in a dual-species model. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 122(10), 951–960. <https://doi.org/10.1111/apm.12238>

Zeng, G., Vad, B. S., Dueholm, M. S., Christiansen, G., Nilsson, M., Tolker-Nielsen, T., Nielsen, P. H., Meyer, R. L., & Otzen, D. E. (2015). Functional bacterial amyloid increases *Pseudomonas* biofilm hydrophobicity and stiffness. *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01099>

Zhu, B., Lorna C, M., Todd, K., & Ping, X. (2018). *Streptococcus Sanguinis* Biofilm Formation & Interaction with Oral Pathogens. *Future Microbiology*, 13(8), 915–932. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L622901472%0Ahttp://dx.doi.org/10.2217/fmb-2018-0043>

Zhu, J. T. T., Choi, R. C. Y., Chu, G. K. Y., Cheung, A. W. H., Gao, Q. T., Li, J., Jiang, Z. Y., Dong, T. T. X., & Tsim, K. W. K. (2007). Flavonoids possess neuroprotective effects on cultured pheochromocytoma PC12 cells: A comparison of different flavonoids in activating estrogenic effect and in preventing β -amyloid-induced cell death. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2438–2445. <https://doi.org/10.1021/jf063299z>

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análises da participação dos genes envolvidos na produção de DNA extracelular e exopolissacarídeos na formação de biofilmes por *S. sanguinis*.

Pesquisador: VICTOR ARAGAO ABREU DE FREITAS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13190819.9.0000.5418

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.365.892

Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil

Delineamento da pesquisa: Trata-se de estudo laboratorial, com culturas microbiológicas, que envolverá 6 participantes, com idades entre 25 e 35 anos, 3 de cada sexo, alunos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, dos quais serão coletadas amostras de saliva total estimulada. Este projeto visa investigar o efeito da inativação de genes *srpA*, *iga*, *spxB*, *ssa_0094* e *gtfP* potencialmente envolvidos na interação de *S. sanguinis* com a PA e/ou na produção de componentes da matriz extracelular [DNA extracelular (eDNA) e glucanos produzidos a partir da sacarose], na formação de biofilmes. Para isto, análises *in vitro* serão realizadas para comparar biofilmes formados pela cepa *S. sanguinis* parental SK36 com as respectivas mutantes isogênicas de *srpA*, *iga*, *spxB*, *ssa_0094* e *gtfP*, em meios complexo e quimicamente definido acrescido ou não de sacarose e suplementados com saliva humana. Estágios iniciais de formação de biofilmes serão analisados através de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes formados durante 4 h sobre lamínulas de vidro previamente tratadas com saliva humana. A biomassa de biofilmes formados durante 18 h em placas de poliestireno corados com violeta cristal, também será comparada entre as cepas. A biomassa e estrutura tridimensional de biofilmes formados durante 4, 18 e 24h, serão analisadas através de microscopia confocal.

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

Bairro: Areião

CEP: 13.414-903

UF: SP

Município: PIRACICABA

Telefone: (19)2106-5349

Fax: (19)2106-5349

E-mail: cep@fop.unicamp.br

Caracterização de produção de amilóides por Streptococcus sanguinis sob diferentes formas de crescimento

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

10%	4%	1%	8%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	Submitted to Universidade Estadual de Campinas Documento do Aluno	8%
2	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	1%
3	tjyylly.blogspot.com Fonte da Internet	<1%
4	repositorio.ufsm.br Fonte da Internet	<1%
5	www.e-sciencecentral.org Fonte da Internet	<1%
6	Rui Brito, Ana Damas, Maria Saraiva. "Amyloid Formation by Transthyretin: From Protein Stability to Protein Aggregation", Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents, 2003 Publicação	<1%