



UNICAMP

LÍVIA ARAUJO ALVES

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DOS REGULADORES DE TRANSCRIÇÃO
GÊNICA VICRK E COVR NA EVASÃO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* AO
SISTEMA COMPLEMENTO**

Piracicaba

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

LÍVIA ARAUJO ALVES

**Estudo da participação dos reguladores de transcrição gênica VicRK e CovR
na evasão de *Streptococcus mutans* ao sistema complemento**

*Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestra em Biologia Buco-Dental, Área de
Microbiologia e Imunologia Oral*

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

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação
defendida por Lívia Araujo Alves e orientada pela
Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner.

Assinatura da Orientadora

Piracicaba

2014

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

AL87e Alves, Livia Araujo, 1988-
Estudo da participação dos reguladores de transcrição gênica VicRK e CovR na evasão de *Streptococcus mutans* ao sistema complemento / Livia Araujo Alves. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Renata de Oliveira Mattos Graner.
Coorientador: Flávia Sammartino Mariano Rodrigues.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ativação do complemento. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Fatores de virulência. I. Mattos Graner, Renata de Oliveira, 1971-. II. Mariano, Flávia Sammartino. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Analysis of the roles of the transcriptional regulators VicRK and CovR in the susceptibility of *Streptococcus mutans* to opsonization by the complement system

Palavras-chave em inglês:

Complement activation

Virulence factors

Streptococcus mutans

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Mestra em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Renata de Oliveira Mattos Graner [Orientador]

Eliane Namie Miyaji

Rafael Nobrega Stipp

Data de defesa: 26-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2014, considerou a candidata LÍVIA ARAUJO ALVES aprovada.

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

Profa. Dra. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Eliane Namie Miyaji".

Profa. Dra. ELIANE NAMIE MIYAJI

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Rafael Nobrega Stipp".

Prof. Dr. RAFAEL NOBREGA STIPP

Resumo

Streptococcus mutans (SM) é um patógeno oral da cárie dentária e endocardite infecciosa. Para se estabelecer no hospedeiro, SM precisa se adaptar às condições biofísicas e aos fatores de defesa do hospedeiro. Para isto, SM utiliza sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (SDC). Dois SDCs, VicRK e CovR, são associados à virulência de SM. O objetivo deste trabalho foi investigar a participação dos reguladores de transcrição gênica VicRK e CovR na evasão de SM ao sistema complemento e fagocitose. Dessa forma, a marcação pelo complemento foi comparada entre os mutantes *vick*- e *covR*- obtidos da cepa SM UA159 (UAvic e UAcov, respectivamente) e UA159, através da incubação com soro humano a 20% ou soro humano livre de C1q (30 min, 37 °C, 10% CO₂). A deposição de C3b sobre a superfície de SM foi analisada também nas cepas cultivadas em meio com 0,1% de sacarose. A quantidade de C3b nas superfícies bacterianas foi determinada através de reações com anticorpos IgG de cabra anti-C3 humano conjugado com FITC e análise de citometria. Bactérias incubadas com PBS foram usadas como controle negativo. O reconhecimento das cepas de SM por anticorpos séricos opsonizantes foi realizado com anticorpos anti-IgG humano conjugado com FITC e anti-IgM humano conjugado com APC. Para análise da fagocitose, as mesmas cepas coradas com FITC foram incubadas com neutrófilos (PMN) por 5 e 30 min. na presença ou ausência de soro humano a 20%; o número de PMN com bactérias fagocitadas foi determinado por citometria de fluxo. A deposição de C3b foi menor em UAcov (10,86%) e em UAvic (7,6%), comparado à UA159 (23,5%). Na presença de sacarose, a marcação por C3b caiu para 10,86% em UA159, e para os mutantes UAcov e UAvic foi reduzida a 6,6 e 3,96%, respectivamente (ANOVA $p < 0,001$). Os mutantes UAcov e UAvic foram menos reativos contra anticorpos IgG e IgM. A fagocitose por PMN foi reduzida em UAcov e UAvic em cerca de 50 a 60% em relação à UA159 nos tempos de 5 e 30 min. (ANOVA $p < 0,005$). Assim, a inativação dos sistemas VicRK e CovR reduz significativamente a deposição de

C3b do complemento e a frequência de fagocitose de SM, indicando que estes SDC regulam genes envolvidos no escape à opsonização pelo complemento.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, Fatores de virulência, Ativação do Complemento.

Abstract

Streptococcus mutans (SM) is an oral pathogen of dental caries and infective endocarditis. To get established in host sites, SM needs to adapt to biophysical conditions and host defense factors. To this purpose, SM applies transcriptional regulatory systems of two components (SDC). Two SDCs, VicRK and CovR, have been implicated in SM virulence. The aim of this study was to investigate the role of VicRK and CovR on SM evasion from complement system and phagocytosis by neutrophils (PMN). Thus, complement deposition was compared between *vicK*- and *covR*- mutants obtained strain UA159 (UAvic and UAcov, respectively) and the parent UA159 exposed to 20% human serum or human serum depleted of C1q (30 min, 37°C, 10% CO₂). Deposition of C3b on SM surfaces was also analyzed in strains cultivates in the presence of 0.1% sucrose. The amount of C3b on the bacterial surface was determined by reactivity with goat IgG antibody anti-C3 conjugated FITC and flow cytometry analysis. Bacteria incubated with PBS were used as negative control. The reactiveness of SM strains with human serum antibodies was quantified by flow cytometry with anti-human IgG- FITC and anti- human IgM-APC antibodies. For analysis of phagocytosis, the strains stained with FITC were incubated with PMN during 5 and 30 min. in the presence or absence of 20% human serum; the number of internalized bacteria by PMN was determined by flow cytometry. The deposition of C3b on UAcov (10.86 %) and UAvic (7.6%) was lower, compared to UA159 (23.5%) (ANOVA $p < 0,001$). In the presence of sucrose, C3b deposition decreased to 10.86 % in UA159, and to 6.6 and 3.96% in UAcov and UAvic , respectively (ANOVA $p < 0.001$). The UAcov and UAvic mutants were less reactive with IgG and IgM antibodies. The phagocytosis by PMN was 50 to 60% reduced in UAcov and UAvic compared to UA159, respectively at times 5 and 30 min. (ANOVA $p < 0.005$). Thus, inactivation of CovR and VicRK TCS systems significantly reduces deposition of complement C3b and phagocytosis by PMN in a serum-dependent way, indicating that these SDC regulate genes involved in the evasion of complement to opsonization.

Keywords: *Streptococcus mutans*, Virulence factors, Complement Activation.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
3 PROPOSIÇÃO	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
5 RESULTADOS	21
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41
ANEXO 1	53
ANEXO 2	59

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida.

E aos meus pais, Ivo Severiano Alves e Josefa Lima de A. Alves, por não medirem esforços para meu futuro.

Com carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

Antes e acima de tudo, agradeço a Deus, meu constante guia e protetor.

À minha família - meu pai (Ivo Severiano Alves), minha mãe (Josefa Lima de A. Alves) e meu irmão (Igor Araújo Alves), que tem sido um forte pilar na minha vida. Aos meus pais, agradeço por acreditarem em mim desde o começo desta jornada. Sem seu precioso apoio, nada disso seria realidade hoje.

À Universidade Estadual de Campinas na pessoa do Reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge, e a Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por meio do diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, pela oportunidade cedida.

À Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa da Coordenadora Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia e da assessoria, Ana Paula Carone, pela pronta atenção dispensada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Renata de Oliveira Mattos Graner, pela orientação, pelo incentivo e por ter me acolhido na pesquisa. A ela, minha eterna admiração.

À minha coorientadora, Flávia Sammartino Mariano Rodrigues, pela ajuda, paciência e dedicação dispensada durante todas as fases deste trabalho. Lembrando de agradecer por todos os ensinamentos de Imunologia, que me fizeram encantar por esta área.

Aos examinadores que aceitaram compor a banca de dissertação (em ordem alfabética), titulares: Profa. Dra. Eliane Namie Miyaji e Prof. Rafael Nobrega Stipp; suplentes: Profa. Dra. Ana Paula de Souza Pardo e Prof. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa.

Aos examinadores que compuseram a banca de qualificação, Prof. Dr. José Francisco Hofling, Profa. Dra. Karina Cogo Müller e Prof. Dr. Ricardo Della Coletta.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (em ordem alfabética) Erika Harth Chú, Fabiana Paganotti Roque, Italo Sarto Carvalho Rodrigues, Manoel Francisco Rodrigues Netto, Mariana Ferreira Dib João,

Marcelle Marie Buso Ramos, Paula Cristina Anibal, Simone Nataly Busato, Thaís Harder de Palma, Thaís Rodrigues de Carli e Thaís Rossini de Oliveira.

Aos funcionários desta Faculdade, Valeria Alessandra Defavari Franco, técnica do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Oral, Fabio Haach Téo, técnico do aparelho Citômetro de Fluxo e a estagiária, Giovana Claudia Boni.

Em especial, gostaria de agradecer a Natália Leal Vizoto, pelos primeiros ensinamentos no Laboratório, os quais levarei sempre comigo. Você sempre será meu referencial!

À minha amiga, Tarsila Mendes de Camargo, que sempre me apoiou quando preciso. Estivemos juntas numa ajuda mútua.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos recursos concedidos para a realização desse trabalho, sob número 2012/04222-5 (Bolsa de Mestrado) e 2012/50966-6 (Auxílio Regular à Pesquisa).

Ao CNPq pela bolsa de mestrado fornecida nos 3 primeiros meses do mestrado.

Aos amigos que conquistei durante esses anos em Piracicaba, que foram responsáveis pelo meu engrandecimento pessoal.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com esse trabalho durante esses anos.

*“Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje.
Temos de saber o que fomos para saber o que seremos”*

Paulo Freire

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: grau Celsius.

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

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

APC: fluorocromo que absorve e emite uma luz vermelha (de *Allophycocyanin*).

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

AtIA: autolisina A.

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

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

C1q: proteína do complemento que inicia a via clássica.

C3b: fragmento de clivagem da proteína C3 do complemento.

CBP: proteínas ligadoras de colina (de *colin binding protein*).

CWH: enzima com ação hidrolase de parede celular (de *Cell Wall Hydrolase*).

covR: gene codificador da proteína regulatória CovR (de *Control of virulence response regulator*).

erm: antibiótico eritromicina.

Fase log: fase logarítmica de crescimento.

FbsA: proteína de ligação de fibrinogênio de *Streptococcus agalactiae*.

Fc: fração cristalizável do anticorpo.

FITC: fluorocromo derivado da fluoresceína que absorve e emite luz verde (de *fluorescein isothiocyanate*).

GAS: group A streptococci (*Streptococcus pyogenes*).

GBS: group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*).

Gbps: proteínas ligadoras de glucano.

Gtfs: glicosiltransferases.

HK: histidina-quinase.

iC3b: fragmento inativo de C3b.

IgG: Imunoglobulina G.

IGM: Imunoglobulina M.

Lmb: Laminina.

LytA: principal autolisina pneumocócica.

MOIs: proporção de agentes infecciosos (bactéria) para alvos de infecção (célula) (de multiplicity of infection).

PMN: Polimorfonucleares.

PavA: proteína de adesão e virulência de *Streptococcus pneumoniae* (de Pneumococcal adhesion and virulence A).

PBS: solução de fosfato e sal (de phosphate buffered saline)

PBST: solução de PBS acrescida de Tween₂₀.

PcsB: proteína requerida para separação celular (de protein required for cell separation B).

PspA: proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* (de pneumococcal surface protein A).

RPMI: meio utilizado para cultura de células e tecidos (de Roswell Park Memorial Institute medium).

RR: regulador de resposta.

SM: *Streptococcus mutans*.

TCS: sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (de Two Component System).

UA159: cepa de referência de *Streptococcus mutans*.

UAcov: mutante por ausência do gene *covR*.

UAcov+: mutante complementado do gene *covR*.

UAvic: mutante do gene *vick*.

UAvic+: mutante complementado do gene *vick*.

Ufc: unidade formadora de colônia.

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

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

1 INTRODUÇÃO

Streptococcus mutans (SM) é uma espécie comum da cavidade bucal de humanos. Além de seu importante papel na etiologia da cárie dentária, SM é comumente envolvido na etiologia de endocardite bacteriana, outra doença biofilme-dependente, que ocorre em indivíduos susceptíveis que sofrem bacteremia de origem oral (Chia *et al.*, 2001; Lockhart *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 2009).

Diversas espécies bacterianas têm desenvolvido propriedades específicas para colonizar os diferentes locais da cavidade oral, os quais são submetidos a constantes mudanças ambientais (Nicolas & Lavoie, 2011). A alta frequência de SM na microbiota bucal de humanos indica a capacidade desta espécie em se adaptar e sobreviver aos estresses ambientais os quais incluem os diversos fatores de defesa presentes na cavidade bucal (Kreth *et al.*, 2009). A virulência de SM em doenças bucais e sistêmicas também é dependente da capacidade destes microrganismos se adaptarem às condições de estresse durante o processo de infecção do hospedeiro, como ocorre com diversos patógenos (Stephenson & Hoch, 2002).

Os SDCs (Sistemas de Dois Componentes) são sistemas reguladores de transcrição gênica fundamentais para a resposta bacteriana a diversos estímulos ambientais (Stephenson & Hoch, 2002; Raghavan & Groisman, 2010). Um SDC típico é composto por um receptor de membrana, normalmente uma histidina-quinase (HK) que se auto-fosforila em resposta a um estímulo específico, e uma proteína reguladora intracelular denominada regulador de resposta (RR), o qual é ativado por fosforilação pelo receptor cognato para se ligar às sequências reguladoras dos genes alvo, reprimindo ou induzindo a transcrição dos mesmos. SM possui o SDC VicRK e o RR órfão CovR, cujo receptor de membrana cognato (CovS) não foi identificado. Esses SDCs regulam de forma antagônica diversos fatores de virulência, entre eles, fatores associados à formação de biofilmes (Stipp *et al.*, 2013). VicRK induz a expressão dos genes *gtfB/C/D* e *gbpB* (Senadheera

et al., 2005; Duque *et al.*, 2011), enquanto CovR reprime estes mesmos genes de virulência (Biswas *et al.*, 2007; Stipp *et al.*, 2013). A inativação de *covR* em UA159, aumenta a expressão de diversas proteínas envolvidas na biogênese da parede celular. A inativação de *vick* também promove forte aumento na expressão da hidrolase de mureína *smaA* (Stipp *et al.*, 2013).

Além dos fatores de defesa presentes na saliva, os fatores séricos também são importantes no controle dos biofilmes dentários, atingindo a cavidade bucal através do exsudato gengival, também chamado fluído crevicular (Rudney *et al.*, 2005). Dentre os componentes séricos, o sistema complemento é um componente essencial do sistema imune inato de humanos, sendo composto por diversas proteínas solúveis do soro, além de receptores e proteínas de membrana reguladoras (Abbas & Lichtman, 2007). As proteínas solúveis, ao reagir com a superfície bacteriana são ativadas e reagem em cascata, o que leva à deposição irreversível da proteína C3b nas superfícies bacterianas. C3b/iC3b são fragmentos de clivagem do componente C3, sendo o iC3b o seu fragmento inativo, ambos funcionam então como opsoninas, facilitando o reconhecimento (através de seus receptores para C3b/iC3b) e fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos (PMN) do hospedeiro (Ricklin & Lambris, 2007).

Patógenos do gênero *Streptococcus* apresentam diversos componentes de escape ao sistema complemento (Mitchell, 2003). Estes incluem as cápsulas polissacarídicas que impedem a deposição de C3b/iC3b na superfície bacteriana (Mitchell, 2003; Hyams *et al.*, 2010). Além disso, proteínas da superfície de estreptococos que se ligam aos componentes do sangue do hospedeiro (por exemplo, fibrinogênio, albumina e proteínas reguladoras solúveis do complemento) favorecem o escape ao sistema complemento (Mitchell, 2003). A inativação de *covR* compromete a capacidade de SM de sobreviver e/ou crescer em saliva (Vizoto, 2011). Além disto, a inativação de *covR* promove resistência à fagocitose por PMNs em sangue humano (Negri *et al.*, 2012). Diversas proteínas de superfície de SM reguladas por CovR e consideradas como importantes para a capacidade de formação de biofilmes, como a GtfB e GbpC,

parecem influenciar na susceptibilidade de SM à fagocitose e na capacidade de causar bacteremia e endocardite bacteriana, por mecanismos não compreendidos (Nakano *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2004; Nomura *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 2009). Por outro lado, CovR regula diversas proteínas envolvidas na biogênese de parede celular e na síntese de polissacarídeos extracelulares (Stipp *et al.*, 2013), cujas funções no escape de SM ao sistema imune precisa ser investigada (Negrini *et al.*, 2012). É possível que SM também apresente proteínas de superfície, importantes no escape à marcação pelo complemento e à fagocitose, uma vez que estes microrganismos sobrevivem pelo menos 4 dias na corrente sanguínea em experimentos de bacteremia em modelo animal (Nakano *et al.*, 2004). Como os sistemas VicRK e CovR regulam diversas proteínas de superfície associadas à virulência e biogênese da parede celular e a inativação destes sistemas em SM reduz drasticamente a fagocitose por PMN na presença de sangue (Negrini *et al.*, 2012), é provável que VicRK/CovR regulem fatores de escape ao sistema complemento. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi investigar a participação dos reguladores de transcrição gênica VicRK e CovR na susceptibilidade de *Streptococcus mutans* à opsonização pelo sistema complemento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Importância de *Streptococcus mutans* na microbiota dos biofilmes dentários cariogênicos

A cavidade oral representa uma das superfícies humanas com maior carga e diversidade de microrganismos (Marsh, 2005; Jenkinson & Lamont, 2005; Kuramitsu *et al.*, 2007). As superfícies dentárias são as principais responsáveis por estas características, pois albergam os biofilmes dentários (ou placa dental), os quais consistem de bilhões de microrganismos organizados em uma matriz extracelular composta principalmente de produtos microbianos, incluindo-se principalmente polissacarídeos extracelulares (Marsh, 2005; Bowen & Koo, 2011). Estima-se que 20% das bactérias orais cultiváveis são estreptococos (Schachtele *et al.*, 2007).

Os estágios iniciais da formação de biofilme dental envolvem interações específicas entre adesinas bacterianas com componentes salivares ou produzidos por microrganismos adsorvidos à superfície dos dentes (por exemplo, polissacarídeos extracelulares) (Bowen & Koo, 2011). Estreptococos correspondem entre 60 a 80% do biofilme dental formado durante as primeiras 8 h após a limpeza dos dentes (Diaz *et al.*, 2006) e continuam predominando nos biofilmes dentários durante as 24 horas de formação de biofilme (Nyvad & Kilian, 1987; Aas *et al.*, 2005). Estes organismos pioneiros fornecem novos receptores de superfície e mudam as condições ecológicas através de suas atividades metabólicas, permitindo a colonização por sucessivas espécies (Marsh, 2005; Diaz *et al.*, 2006). A síntese bacteriana de matriz extracelular, especialmente polissacarídeos insolúveis, permite o acúmulo de mais microrganismos e pode desempenhar funções para aderência, reserva de substratos e escape de fatores de defesa do hospedeiro (Banas & Vikerman, 2003; Smith & Mattos-Graner, 2008; Bowen & Koo, 2011). SM tem papel fundamental neste processo, pois secreta enzimas que sintetizam glucanos insolúveis a partir da sacarose, os quais também interagem com a superfície de outras espécies (Bowen & Koo, 2011). Estas

enzimas são denominadas glucosiltransferases B, C (GtfB e GtfC, respectivamente). Além disto, SM produz proteínas associadas à parede celular que se ligam com afinidade aos glucanos, sendo denominadas proteínas ligadoras de glucano (Gbps, de *glucan-binding proteins*) (Banas & Vickerman, 2003).

Além de interagir com receptores de superfície e com a matriz extracelular, as espécies microbianas devem lidar com vários estresses no biofilme, por exemplo, mudanças drásticas na temperatura, pH, pressão osmótica, exposição a agentes oxidantes e fatores imunes do hospedeiro (Smith & Spatafora, 2012). Membros do biofilme oral com capacidade de sentir e responder a uma condição de estresse em particular tem uma vantagem competitiva e aumentam em proporção dentro de seu nicho ecológico. SM tem uma maior capacidade de responder eficientemente aos estresses dos biofilmes dentários, o que os torna predominantes em biofilmes cariogênicos. Por exemplo, SM mantém um metabolismo fermentativo com produção de ácidos em pH baixos ($\approx 5,0$) e tolera pHs extremamente baixos ($\approx 3,0$), os quais não são suportados por espécies comensais de *Streptococcus* (Smith & Spatafora, 2012). Assim, SM é predominante nos biofilmes dentários de pessoas que consomem sacarose com alta frequência (Marsh, 2005). O baixo pH mantido por longos períodos em biofilmes ricos em SM causam a desmineralização progressiva dos dentes, com desenvolvimento das lesões de cárie. Em condições menos extremas, as espécies comensais podem predominar, sendo os biofilmes dentários compatíveis com a saúde (Marsh, 2005; Diaz *et al.*, 2006).

2.2 Participação de *Streptococcus mutans* em doenças bucais e/ou sistêmicas

Há evidências que as espécies bucais do gênero *Streptococcus*, podem estar envolvidas em doenças sistêmicas em pessoas saudáveis e pessoas imunocomprometidas (Hohwy *et al.*, 2001). Embora os dentes sejam o principal nicho ecológico de SM, estes microrganismos podem também colonizar a mucosa bucal (Caufield *et al.*, 1993; Caufield, 2000; Milgrom *et al.*, 2000; Alves *et al.*,

2009). Para colonizar e se estabelecer nos biofilmes dentários SM precisa sintetizar e interagir com uma matriz extracelular, cujo principal componente são polissacarídeos. Esta matriz influencia na ecologia dos biofilmes, alterando características ecológicas importantes, como a densidade das populações microbianas, a disponibilidade de nutrientes, a difusão de metabólitos e o escape microbiano a fatores de defesa do hospedeiro (Duque *et al.*, 2011). A formação e maturação de biofilmes é, entretanto, precedida por estágios em que bactérias livres na saliva sejam capazes de sobreviver a diversos fatores de defesa da saliva do hospedeiro, de se aderir aos dentes e adaptarem-se fisiologicamente às novas condições locais para se multiplicar e iniciar a formação dos biofilmes (Kreth *et al.*, 2009). A alta frequência de SM na microbiota de humanos indica capacidade desta espécie em se adaptar e sobreviver a diversos fatores de defesa presentes na cavidade bucal (Kreth *et al.*, 2009; Negrini *et al.*, 2012).

Além do papel importante na etiologia da cárie dentária, SM é comumente envolvido na etiologia de endocardite bacteriana, outra doença biofilme-dependente, que ocorre em indivíduos susceptíveis que sofrem bacteremia de origem oral (Chia *et al.*, 2001; Lockhart *et al.*, 2008; Nakano *et al.*, 2009). A virulência de SM em doenças bucais e sistêmicas também é dependente da capacidade destes microrganismos de detectar e se adaptar a condições de estresse durante o processo de infecção do hospedeiro, como ocorre com diversos patógenos (Stephenson & Hoch, 2002). Além dos fatores de defesa presentes na saliva, os fatores séricos também são importantes no controle dos biofilmes dentários associados à gengiva. Estes componentes atingem a cavidade bucal através do epitélio do sulco gengival, como parte de um fluido gengival denominado fluido crevicular (Rudney *et al.*, 2005). O fluido crevicular é importante para o controle do biofilme dentário subgengival, no qual *Streptococcus* também se apresentam em proporções relativamente altas (Marsh, 2005).

A alta proporção de SM nos biofilmes dentários cariogênicos permite com que estes microrganismos atinjam a corrente sanguínea. Estas bacteremias transitórias podem permitir a aderência de SM às válvulas cardíacas danificadas,

ao interagir com estruturas denominadas “vegetação”, formadas pelo acúmulo de fibrina, plaquetas, e células inflamatórias sobre as células endoteliais lesadas (Parsek *et al.*, 2003; Paik *et al.*, 2005). Bacteremias transitórias podem ocorrer como consequência de qualquer fator que promova o sangramento gengival, como a escovação dentária, ou através de procedimentos odontológicos (Lockhart *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2009). Embora a profilaxia antibiótica seja recomendada antes de procedimentos odontológicos invasivos, os antibióticos não podem realisticamente ser usados para prevenir bacteremias em pacientes de risco, sendo evidentes endocardites causadas por microrganismos bucais sem histórico de procedimentos odontológicos (Moirellon & Que, 2004; Paik *et al.*, 2005). Após o acesso à corrente sanguínea, bactérias bucais podem ainda participar como agentes desencadeadores ou complicadores de doenças sistêmicas como a aterosclerose, diabetes e doenças auto-imunes (Stinson *et al.*, 2003; Herzberg *et al.*, 2005; Lockhart *et al.*, 2008; Parahitiyawa *et al.*, 2009). SM são detectados em amostras de sangue e de tecido cardiovascular, tais como das válvulas do coração e placas ateroscleróticas, em indivíduos acometidos por endocardite bacteriana (Nakano *et al.*, 2007; Lockhart *et al.*, 2008). Alguns sorotipos de SM são ainda capazes de invadir e promover a morte de células endoteliais *in vitro*, o que pode contribuir para o envolvimento destes microrganismos na patogenia da endocardite e aterosclerose (Stinson *et al.*, 2003; Abranches *et al.*, 2008).

2.3 Papel das proteínas reguladoras VicRK e CovR na virulência de bactérias do gênero *Streptococcus*

Os SDCs são sistemas básicos fundamentais para a resposta bacteriana a diversos estímulos ambientais (Stephenson & Hoch, 2002; Raghavan & Groisman, 2010). Um SDC típico é composto por um receptor de membrana, normalmente uma histidina-quinase (HK), e uma proteína reguladora intracelular denominada regulador de resposta (RR). A porção externa do receptor HK é ativada por um estímulo ambiental específico, sofrendo fosforilação na sua porção intracelular (Raghavan & Groisman, 2010). O grupo fosfato é então transferido

para o RR cognato, o qual sofre modificação da sua conformação para se ligar às sequências reguladoras dos genes alvo, o que pode reprimir ou induzir a transcrição dos mesmos. Os genes que codificam os SDC são mais frequentemente organizados em operons, mas há HK ou RR designados “órfãos”, quando codificados por genes isolados, isto é, sem seu respectivo par. O genoma da cepa de SM UA159 contém pelo menos 14 SDC completos (Biswas *et al.*, 2008b; Chong *et al.*, 2008). Alguns destes sistemas tem sido investigados em maior detalhe, como o SDC VicRK, CiaHR, ComCDE, envolvidos respectivamente, na regulação positiva de genes importantes para a formação de biofilmes e divisão celular, biossíntese de bacteriocinas e competência (Li *et al.*, 2002; Qi *et al.*, 2004; Senadheera *et al.*, 2005; Duque *et al.*, 2011). Além disto, o regulador órfão CovR, também conhecido como GcrR (de *Glucan binding protein Cregulator*), regula a produção de fatores de virulência como as GtfB/C, GbpC e GbpB (Idone *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2005; Biswas & Biswas 2006; Biswas *et al.*, 2007; Stipp, 2010). Os SDC VicRK e CovR regulam de forma antagônica diversos fatores de virulência, entre eles fatores associados à formação de biofilmes. VicRK induz a expressão dos genes *gtfB/C/D* e *gbpB* (Senadheera *et al.*, 2005), enquanto CovR reprime estes mesmos genes de virulência (Biswas *et al.*, 2007; Stipp *et al.*, 2008). O papel da maioria dos SDC ainda não é conhecido, embora 11 deles sejam conservados em diversas cepas da espécie SM (Biswas *et al.*, 2008).

Em *S. pneumoniae*, os sistema VicRK regula o ortólogo de GbpB (denominado PcsB), e diversos fatores de virulência, inclusive a produção de proteína de superfície PspA envolvida no escape ao sistema complemento (Ng *et al.*, 2005). Recentemente, demonstramos que a inativação de VicRK na cepa SM UA159 reduz drasticamente a fagocitose destes microrganismos por neutrófilos no sangue humano (Negrini *et al.*, 2012). Estudos realizados em *S. pyogenes* e *S. agalactiae* sugerem que fatores do hospedeiro presentes no fluido tecidual, saliva e sangue compreendam estímulos para o sistema CovRS (Gryllos *et al.*, 2001; Shelburne, III *et al.*, 2005b; Gryllos *et al.*, 2007; Gryllos *et al.*, 2008). O sistema CovRS é um dos sistemas mais estudados em *S. pyogenes* porque regula

diversas funções de virulência durante os processos de infecção, as quais também incluem fatores antifagocíticos e genes metabólicos (Graham *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2005; Mereghetti *et al.*, 2008). Em SM, CovR regula os genes de virulência que codificam GtfB/C/D, GbpB e GbpC (Idone *et al.*, 2003; Biswas & Biswas 2006; Biswas *et al.*, 2007; Stipp, 2010). Entretanto em SM, o *locus* de *covR* não contém o gene que codifica o receptor cognato CovS. Uma vez que CovR é um repressor de GtfB/C, GbpC (Biswas & Biswas, 2006; Biswas, Drake, Biswas, 2007) e GbpB (Stipp, 2010), a inativação *covR* em SM aumenta significativamente a formação de biofilmes de SM na presença de sacarose (Stipp, 2010). Recentemente, verificamos que a inativação de *covR* compromete drasticamente a capacidade de SM de sobreviver e/ou crescer em saliva (Vizoto, 2011). Além disto, a inativação de CovR promove resistência à fagocitose por PMN do sangue humano (Negrini *et al.*, 2012). Diversas proteínas de superfície de SM reguladas por CovR e consideradas como importantes para a capacidade de formação de biofilmes, como a GtfD e GbpC, parecem influenciar na susceptibilidade de SM à fagocitose e na capacidade de causar bacteremia e endocardite bacteriana (Nakano *et al.*, 2002; Nakano *et al.*, 2004; Nomura *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 2009). Outros componentes ainda não identificados do *regulon* de CovR com participação no escape à fagocitose precisam ser identificados (Negrini *et al.*, 2012).

2.4 Fatores de *Streptococcus* que influenciam a marcação pelo sistema complemento e escape à fagocitose

O complemento é um componente essencial do sistema imune inato de humanos, sendo composto por diversas proteínas solúveis do soro, além de receptores e proteínas de membrana reguladoras (Abbas & Lichtman, 2007). As proteínas solúveis, ao reagir com a superfície bacteriana são ativadas e reagem em cascata, o que leva à deposição irreversível da proteína C3b nas superfícies bacterianas. O sistema complemento pode ser ativado de forma dependente (via clássica) ou independente de anticorpos (vias da lectina e alternativa), mas todas

elas resultam na ligação covalente de C3b ou iC3b (forma resultante da via alternativa) às paredes celulares das bactérias Gram-positivas. C3b/iC3b funcionam então como opsoninas, facilitando o reconhecimento e fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos (PMN) do hospedeiro (Abbas & Lichtman, 2007). Ativação do complemento também gera mediadores inflamatórios, como os componentes C5a, C3a e C4a, os quais atuam como agentes quimiotáticos e ativadores de fagócitos entre outras funções inflamatórias. Portanto, a ação de fagócitos (macrófagos, células dendríticas e PMN) é altamente dependente da atividade do complemento (Haas *et al.*, 2002; Ricklin & Lambris, 2007; Yuste *et al.*, 2008). Outros componentes do complemento ainda melhoram a resposta imune adaptativa mediada por anticorpos e a ação dos linfócitos T (Ricklin & Lambris, 2007).

Dentre as vias ativação do sistema complemento, a via clássica é iniciada por alguns isotipos de anticorpos, os quais incluem IgM e IgG (subclasses IgG1 e IgG3 em humanos). Ao se ligarem aos antígenos da superfície bacteriana, as regiões Fc dos anticorpos IgM ou IgG são capazes de reagir com proteínas C1q do complemento, ocorrendo em sequência uma cascata de ativação que resultará no recobrimento da superfície bacteriana por C3b (Kang *et al.*, 2006; Abbas & Lichtman, 2007). As vias alternativas e da lectina são ativadas na ausência de anticorpos, fazendo parte da imunidade inespecífica do organismo. Na via alternativa basta a presença no patógeno de determinadas características químicas, especialmente ausência de ácido siálico, ou ausência de proteínas reguladoras em sua membrana para a via alternativa seja desencadeada. A via da lectina apresenta lectinas ligadoras de manana, encontradas no soro, que se ligam a grupos de manose encontrados na superfície de algumas bactérias e essa ligação desencadeia a ativação da cascata do complemento (Jorge, 2010).

Patógenos do gênero *Streptococcus* apresentam diversos componentes de escape ao sistema complemento (Mitchell, 2003). Estes incluem as cápsulas polissacarídicas que impedem a deposição dos fragmentos C3b/iC3b decorrentes da via clássica e alternativa de ativação do complemento (Mitchell, 2003; Hyams

et al., 2010). Além disso, proteínas da superfície de estreptococos que se ligam aos componentes do sangue do hospedeiro (por exemplo, fibrinogênio, albumina e proteínas reguladoras solúveis do complemento) favorecem o escape ao sistema complemento (Mitchell, 2003). Por exemplo, os estreptococos do grupo B (GBS) produzem a proteína de ligação à laminina (Lmb), uma lipoproteína que tem semelhança ao Lral da família de adesinas. Ortólogos de Lmb estão presentes no genoma de SM, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*. Existem várias Lmb no genoma dos GBS. Um deles, FbsA (proteína de ligação de fibrinogênio de *S. agalactiae*), protege GBS da opsonização. Outro fator contém domínios semelhantes à proteína PavA, um fator de virulência identificado em *S. pneumoniae* (PavA de *Pneumococcal adhesion and virulence A*) (Mitchell, 2003). O genoma de SM contém um gene que codifica uma proteína semelhante a PavA, além do ortólogo da PsaA de *S. pneumoniae*, a qual é regulada por VicRK nesta última espécie (Ng *et al.*, 2005). Dados preliminares obtidos em nosso laboratório indicam que os genes ortólogos de PavA e PspA de SM são reprimidos por CovR. Isto poderia explicar, pelo menos em parte, a drástica redução da fagocitose de SM por PMN em sangue promovida pela inativação de *covR*, descrita recentemente por nosso grupo (Negrini *et al.*, 2012).

Streptococcus spp. apresentam diversos outros mecanismos de evasão ao complemento. Um deles descrito em GBS, envolve a expressão de proteínas α e β ; a proteína β liga-se à porção Fc dos anticorpos IgA (IgA-Fc) e ao fator regulador H do complemento, o qual impede a ativação da cascata do complemento sobre as células humanas. Diversas proteínas das três famílias de proteínas de superfície bacteriana [proteínas ancoradas através do domínio LPTxG, proteínas ligadoras de colina (CBP) e lipoproteínas] parecem influenciar na marcação pelo complemento (Mitchell, 2003). As CBP são ligadas não covalentemente à colina dos ácidos teicóicos ou lipoteicóicos da parede celular através de um domínio C-terminal. Embora identificadas originalmente em *S. pneumoniae*, sabe-se que diversas espécies bucais como *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis* apresentam colina associada a ácidos teicóicos e/ou

lipoteicóicos e que Gbps de SM apresentam domínio-C-terminal ligador de colina (Gosink *et al.*, 2000). Em *S. pneumoniae* há diversas CBPs envolvidas na virulência incluindo-se a autolisina LytA, e as proteínas de superfície PspA e PspC (Hyams *et al.*, 2011).

As autolisinas são hidrolases de parede celular (CWHs); CWH compreendem um grande grupo de enzimas que clivam ligações covalentes da parede celular e que podem ter diferentes especificidades, atividades redundantes ou complementares e que frequentemente desempenham mais de uma função fisiológica (Vollmer *et al.*, 2008). Diversas bactérias produzem CWHs envolvidas no remodelamento e renovação da parede celular, separação de septos durante a fissão binária, autólise (morte auto-induzida), competência, montagem de estruturas de superfície celular e formação de biofilmes (Vollmer *et al.*, 2011). Por exemplo, a LytA de *S. pneumoniae* está envolvida na virulência, pois promove autólise e liberação de diversos fatores envolvidos na capacidade de colonizar a orofaringe por mecanismos não bem compreendidos, incluindo-se as CWH LytB e LytC (Mitchell, 2003). Recentemente, demonstrou-se que a inativação de *lytC*, associada ou não à inativação de *lytB* em *S. pneumoniae*, aumenta a deposição C3b, o que indica papel importante destas autolisinas na resistência de *S. pneumoniae* à marcação pelo complemento (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011).

Em SM, a autolisina AltA, aparentemente regulada por VicRK, tem influência na formação de biofilmes (Ahan & Burne, 2006; Ahn & Burne, 2007) e no escape à fagocitose e indução de endocardite bacteriana, possivelmente por se ligar à fibronectina solúvel (Jung *et al.*, 2009). Embora a atividade autolítica não tenha sido demonstrada para GbpB, esta proteína envolvida na formação de biofilmes de SM também tem domínios característicos de autolisinas e está implicada na divisão celular e morfogênese (Mattos-Graner *et al.*, 2001; Duque *et al.*, 2011). Recentemente, identificamos diversas autolisinas reguladas por VicRK e/ou CovR em SM UA159 (Stipp *et al.*, 2013), mas o papel destas proteínas na virulência destas espécies precisa ser elucidada. Uma das nossas hipóteses é que estas autolisinas possam interferir na susceptibilidade bacteriana à marcação pelo

sistema complemento e outros fatores de defesa de forma dependente ou independente da presença de fluídos humanos como sangue e saliva. A cepa UA159 foi isolada de criança com cárie ativa na Universidade do Alabama (Birmingham, AL, E.U.A), sendo a primeira cepa de SM com genoma seqüenciado do sorotipo c, o sorotipo mais comum em isolados bucais (Adjick *et al.*, 2001). Além disto, cerca de 30 e 47% das cepas SM isoladas de válvulas cardíacas e ateromas respectivamente, são do sorotipo c (Nakano *et al.*, 2007).

Há indícios de que Gtfs, produtos (glucanos) e Gbps possam desempenhar um papel no escape à fagocitose (Banas & Vikerman, 2003). Porém, o papel de glucanos, Gtfs e Gbps na patogênese da endocardite infecciosa ainda não é claro. Uma hipótese é que os glucanos produzidos no ambiente oral associados a SM por suas Gtfs e Gbps agiriam como uma cápsula anti-opsonizante (Claverys *et al.*, 2000). A formação de cápsula é importante para o escape à fagocitose e virulência de *S. pneumoniae*. Porém, há variações genéticas consideráveis entre as cepas de *S. pneumoniae* de um mesmo sorotipo capsular e, outros fatores ainda não identificados parecem influenciar na marcação por C3b/iC3 de forma independente da espessura e sorotipo da cápsula e da reatividade com anticorpos IgG e IgM (Hyams *et al.*, 2011).

É possível que SM também apresente proteínas de superfície, importantes no escape à marcação pelo complemento e à fagocitose, uma vez que estes microrganismos sobrevivem pelo menos 4 dias na corrente sangüínea (Nakano *et al.*, 2004). Como os sistemas VicRK e CovR regulam diversas proteínas de superfície associadas à virulência e a inativação destes sistemas em SM reduz drasticamente a fagocitose por PMN na presença de sangue (Negrini *et al.*, 2012), é possível que VicRK/CovR regulem fatores de escape ao sistema complemento.

3 PROPOSIÇÃO:

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a participação dos reguladores de transcrição gênica VicRK e CovR na evasão de *Streptococcus mutans* ao sistema complemento e fagocitose.

Para isto, os objetivos específicos deste projeto incluem:

1) Caracterizar a deposição de C3b/iC3b do sistema complemento de humanos nas cepas SM UA159 crescidas em meio com e sem sacarose.

2) Comparar a ligação de C3b/iC3b à superfície bacteriana em soro humano entre as cepas *knock-out* de *vicK* e *covR* em UA159 (UAvic, UA-cov, respectivamente) e as respectivas cepas selvagem UA159 e mutantes complementados com cópia episomal dos genes inativados (UAvic+, UA-cov+), nas condições determinadas no objetivo específico 1.

3) Comparar a ligação de C3b/iC3b independente de anticorpos à superfície bacteriana em soro humano livre de proteínas C1q, entre as cepas *knock-out* UAvic e UA-cov e as respectivas cepas selvagem UA159 e UAvicVic+, UA-covCov+, nas mesmas condições do objetivo específico 2.

4) Comparar a frequência de fagocitose por PMNs humanos purificados na presença ou ausência de soro humano entre as cepas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas e condições de cultivo

As cepas utilizadas neste estudo incluem *S. mutans* UA159 e os mutantes *knock-out* dos genes *vicK* e *covR* obtidos em UA159 e designados respectivamente UAvic e UAcov. As cepas mutantes UAvic e UAcov complementadas com cópia epissomal intacta dos genes inativados (*vicK* e *covR*) foram respectivamente designadas UAvic+ e UAcov+. Todos os mutantes *knock-out* e complementados foram obtidas em nossos laboratórios em estudos anteriores (Duque *et al.*, 2011; Negrini *et al.*, 2012). Para cada ensaio, as cepas foram cultivadas a partir dos estoques congelados. Para isto, as cepas foram estriadas em agar *Brain Heart Infusion* (BHA) (Merck Labs, Alemanha) acrescido ou não de eritromicina (10µg/ml) e de espectinomicina (200µg/ml) e incubadas a 37°C, em atmosfera com 10% CO₂ (Water-Jacked CO₂ Incubators/Cole Parmer Instruments, EUA) durante 24 h. Após o crescimento, colônias isoladas foram inoculadas em 5 ml de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck Labs, Alemanha) sem ou com eritromicina (BHlerm) e incubadas sob as mesmas condições durante 18h.

4.2 Voluntários e amostras de soro

Amostras de soro foram obtidas de 10 ml de sangue coletados de seis voluntários sadios (três do gênero masculino e três do gênero feminino), com idade entre 25 a 35 anos. Sendo realizada assepticamente, através da punção da veia braquial após assepsia da pele com algodão estéril embebido em álcool 70%. A punção venosa foi realizada pelo método a vácuo, em tubos contendo anticoagulante (heparina sódica), não necessitando que indivíduo estivesse em jejum. A coleta foi realizada por um profissional com experiência e formação na área de Biomedicina.

A seleção dos voluntários para este estudo foi realizada sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba

aprovado pelo protocolo nº 031/2012, conforme definido na Resolução 196/96 relativo à pesquisa com seres humanos. As amostras de soro foram congeladas a -70 °C e usadas como fonte de complemento.

4.3 Ensaio de ligação de C3b/iC3b do complemento sobre a superfície de cepas SM na presença de C1q

Os ensaios para analisar a deposição de complemento sobre UA159 foram realizados como descrito por Brown *et al.* (2002). Para isto, volumes de 140 µl de culturas de SM em BHI (18 h, 37°C, 10% CO₂), foram transferidos para 5 ml de meio fresco BHI e incubadas sob as mesmas condições até atingir uma absorbância (A_{550nm}) de 0,3, correspondente a aproximadamente 5×10^6 a 1×10^7 ufc/ml. Volumes de 500 µl destas culturas foram centrifugados e as bactérias lavadas em volumes de 500 µl de PBS (pH 7,0) por duas vezes. Em seguida, 10 µl destas bactérias foram re-suspendidas em 10 µl de soro diluído a 20% em PBS e incubados durante 30 min. a 37°C. Após a incubação com soro, as bactérias foram lavadas por duas vezes em PBS-Tween 20 a 0,05% (PBST, pH 7.4), re-suspendidas em 50 µl de solução de anticorpos policlonais IgG de cabra anti-C3 humano conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ICN, E.U.A.) diluídos 1:300 em PBST. Após incubação em gelo por 40 min., as bactérias foram lavadas por duas vezes em 300 µl de PBST, centrifugadas (11.000 r.p.m.0 x, 2 min) e re-suspendidas em 300 µl de PBS paraformaldeído a 3% para análise em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), disponível no Departamento de Diagnóstico Oral (FOP-UNICAMP). A intensidade de marcação por C3b/iC3b foi avaliada em pelo menos 25.000 bactérias localizadas no *gate* desenhado através dos parâmetros de tamanho (FCS-*Foward Scatter*) e complexidade (SSC-*Side Scatter*) das células, excluindo a população localizada abaixo de 10^1 no parâmetro SSC. Como controles negativos, bactérias tratadas nas mesmas condições com PBS ao invés de soro, foram analisadas. Os resultados foram expressos como a porcentagem de bactérias fluorescentes em comparação com os controles incubados em PBS.

Ensaio preliminares de deposição do complemento foram realizados com as cadeias bacterianas intactas e sonicadas para redução das cadeias em cocos e diplococos. Para isto, vários tempos de sonicação foram primeiramente testados para melhor separação de cadeias sem interferência na viabilidade. A partir destes testes, foi estabelecido como ideal ciclos de 6 sonicações por 30 seg. com intervalos de 1 min. em banho de gelo (Amplitude 1A e Ciclo 1.0) (Sonicador ultrassônico Hielscher® UP 400 S). Para certificar-se de que a sonicação não afetou a viabilidade das cepas, os números de ufc/ml das suspensões bacterianas sonicadas ou não foram determinados em agar BHI acrescidos ou não de eritromicina (10 µg/ml) e espectinomicina (200 µg/ml), após incubação por 48h (37°C, 10% CO₂). Para investigar a influência do tamanho das cadeias na deposição de C3b bactérias sonicadas ou não foram testadas nas mesmas condições do ensaio descrito no item 4.3. Os ensaios indicaram que a sonicação não interferiu com a marcação de C3b. Portanto os ensaios subsequentes foram realizados sem a etapa de sonicação para evitar possíveis alterações da parede celular.

Ensaio similar foi realizado na presença 0,1% de sacarose para avaliar a influência da produção de polissacarídeo extracelular na superfície celular bacteriana de SM e marcação de C3b/iC3b do complemento.

Os ensaios de deposição C3b independente de anticorpos foram realizados como descrito acima, com amostras de soro humano livre de C1q (Calbiochem, USA). Como controle desta etapa foram utilizados dois soros, o mesmo soro livre de C1q foi complementado com C1q purificado (Calbiochem, USA) na concentração sérica (0,75µg/ml) e o soro normal humano (SNH) de um voluntário com concentrações séricas normais de proteínas do complemento.

Para investigar se componentes presentes no soro humano afetam a viabilidade das cepas, alíquotas das diluições seriadas das suspensões bacterianas incubadas ou não por 30 min. com 20% de soro humano foram semeadas em agar BHI acrescidos ou não de eritromicina (10µg/ml) e

espectinomicina (200µg/ml), e incubadas (37°C, 10% CO₂, 48h), e os números de ufc/ml determinados.

4.4 Determinação das concentrações totais de IgG e IgM reativos contra SM nas amostras de soro

Para investigar a proporção de anticorpos IgG/IgM séricos reativos contra SM, ensaios foram realizados da mesma forma como descrito no item 4.3, com a diferença que foram usados anticorpos de cabra anti-IgG humano conjugado com FITC (Novus Biologicals, E.U.A.) ou anticorpos de camundongo anti-IgM humano conjugados com APC (Biolegend, E.U.A.) diluídos 1:900 e 1:1000 em PBS, respectivamente, como descrito por Yuste *et al.* (2008) adaptado.

4.5 Fagocitose por PMN em sangue humano

A influência da deposição do complemento na fagocitose por PMNs (polimorfonucleares) de sangue humano foi avaliada através determinação da frequência de PMN com bactérias intracelulares fluorescentes. As bactérias marcadas com FITC (vide item 4.5.1) foram incubadas com PMNs purificados do sangue de 1 voluntário (vide item 4.5.2), na presença e ausência de soro humano a 20%. Os PMNs foram cultivados com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com 10% soro fetal bovino inativado e sem antibióticos. As multiplicidades de infecção (MOIs, *multiplicity of infection*) testadas foram de 20 e 200 bactérias por PMN. Após a exposição às bactérias marcadas (37°C, 5% CO₂) durante 5 e 30 min, a quantidade de PMN com bactérias intracelulares foi determinada por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD).

4.5.1 Marcação de cepas com FITC

A marcação das cepas *S. mutans* com FITC (Sigma) foi realizada como descrito por Falk *et al.* (1993), com algumas modificações. Resumidamente, 500 µl de culturas de bactérias em BHI obtidas como descrito no item 4.1 (correspondentes a aprox. 10⁷ bactérias) foram coletadas por centrifugação (11.000 x r.p.m, 2

min., 4°C), lavadas em PBS e ressuspensas em 1 ml de tampão de carbonato de sódio (0,15 M Na₂CO₃ pH 9 contendo 0,9% de NaCl). O volume de 100 µl de solução 10 mg/ml de FITC (preparada imediatamente antes do uso em DMSO) foi adicionado à suspensão bacteriana e as amostras incubadas por 1h em temperatura ambiente, no escuro, sob agitação. A seguir, as bactérias foram separadas através de centrifugação (11.000 x r.p.m, 2 min., 4°C) e lavadas por 3 vezes em 1 ml de PBS com 0,05% de Tween. Alíquotas de 50 µl das suspensões em 1 ml de PBS foram congeladas a -70 °C em 10% glicerol até serem usadas para os experimentos de fagocitose. A eficiência da marcação de todas as cepas foi determinada por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD) e analisada em microscópio de fluorescência (Leica DM LD) em lâminas contendo o mesmo número de bactérias.

4.5.2 Isolamento de PMN de sangue

Os PMNs foram isolados do sangue periférico (10 ml coletado na presença de heparina) de um voluntário selecionado (LAA). O isolamento de PMN foi realizado através de centrifugação por gradiente. Resumidamente, foram adicionados a um tubo cônico de 15 ml, 3,0 ml de Histopaque 1119TM (Sigma), 4,0 ml de Hitopaque 1083TM (Sigma) e 6,0 ml de sangue. Essas amostras foram centrifugadas (450 x g, 25°C, 25 min.) e a camada de granulócitos transferida para outro tubo. As células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) estéril e ressuspensas no mesmo tampão. Após lise das hemácias com cloreto de sódio a 0,2% por 30 s, as células foram novamente lavadas com PBS e os neutrófilos ressuspensos em RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino inativado e sem antibióticos para uma concentração final de aproximadamente 2x10⁵ células/mL de meio. A viabilidade e a concentração de neutrófilos foram determinadas através da contagem das células vivas e mortas (em azul), após coloração com azul de Trypan, com auxílio de microscópio de luz. As amostras utilizadas continham >95% dos PMN viáveis e pureza superior a 94%. A pureza foi determinada pela análise das células isoladas através das características de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD).

4.5.3 Análise da frequência de fagocitose por PMN por citometria de fluxo

Para exposição dos PMN às bactérias fluorescentes, volumes de 50 µl de suspensão das bactérias em RPMI (1640, Sigma) (A_{550nm} : 0,3) contendo 4×10^7 ou 40×10^7 células/ml, foram transferidos para placas de 96 poços contendo 50 µL de 2×10^5 células/mL de PMN (1.000 PMN por poço) em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e sem antibióticos. Assim, as multiplicidades de infecção (MOI) testadas foram de 20 e 200 bactérias por PMN. As bactérias foram incubadas com os PMNs em duas condições: ausência ou presença de soro humano 20%. O soro foi usado como fonte do complemento para opsonização bacteriana. As amostras foram incubadas (37°C, 10% CO₂) durante 5 e 30 min. sob leve agitação. A seguir, a reação de fagocitose foi paralisada com adição de 100 µl de PBS gelado e o volume final de cada poço foi transferido para microtubos de 1,5 ml e centrifugados 2 vezes (500 g. por 8 minutos a 4°C). Em seguida, os PMN foram transferidos para tubos de ensaio (12 x 75 mm), e fixados com 300 µl de PBS paraformaldeído a 1% e analisados em citômetro de fluxo (FACSCalibur. BD) (Jansen *et al.*, 1998). A porcentagem de PMN fluorescentes foi usada como frequência de fagocitose.

4.6 Forma de análise dos resultados

Para as comparações estatísticas, foram utilizadas as médias de três experimentos independentes, sendo usada uma análise da cepa selvagem UA159 para cada mutante. As diferenças na deposição C3b/iC3b entre as cepas selvagem e mutantes UAvic ou UAcov foram analisadas utilizando-se o teste paramétrico ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. O mesmo teste foi realizado para comparações entre os mutantes complementados e cepa selvagem. Diferenças na frequência média de fagocitose (obtidas em três experimentos independentes) entre cepas foram analisadas pelo mesmo teste estatístico, também utilizando-se uma análise de UA159 para cada mutante. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SigmaPlot.

5 RESULTADOS

5.1 Curvas de crescimento e controle da viabilidade das cepas SM UA159, dos mutantes UAcov, UAvic, UAcov+ e UAvic+

As curvas de crescimento das cepas SM UA159, UAcov, UAvic, UAcov+ e UAvic+ foram determinadas nos meios de cultura BHI (Figura 1), BHI acrescido de 0,1% de sacarose (Figura 2) e RPMI (Figura 3), nas condições determinadas no item 4.1, para determinação das absorbâncias (A_{550nm}) referentes à metade da fase exponencial (log) de crescimento. A A_{550nm} 0,3 foi selecionada como correspondentes à metade da fase log em todas as cepas, nas diferentes condições de cultivo testadas.

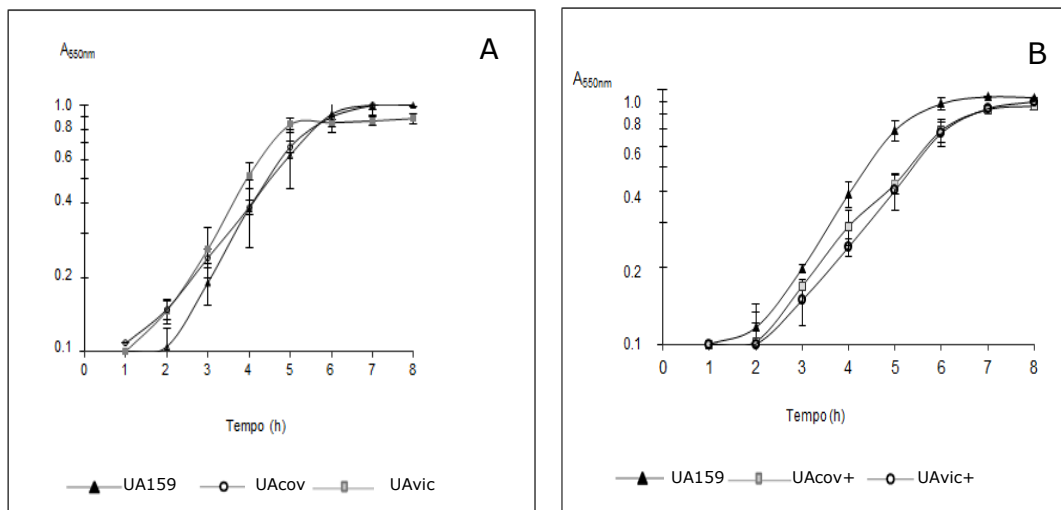


Figura 1 Curvas de crescimento das cepas *S. mutans* em BHI (10% CO₂, 37°C) acrescido de eritromicina (cepas mutantes e complementadas) e espectinomicina (cepas complementadas). A) Comparações das curvas das cepas mutantes UAcov (*covR*-) e UAvic (*vicK*-) com a da cepa selvagem UA159 não indicam diferenças significativas. B) Comparações das curvas das cepas complementadas UAcov+ e UAvic+ com a da cepa selvagem. Os símbolos representam médias de três experimentos independentes realizados em duplicada; as barras indicam os desvios padrão.

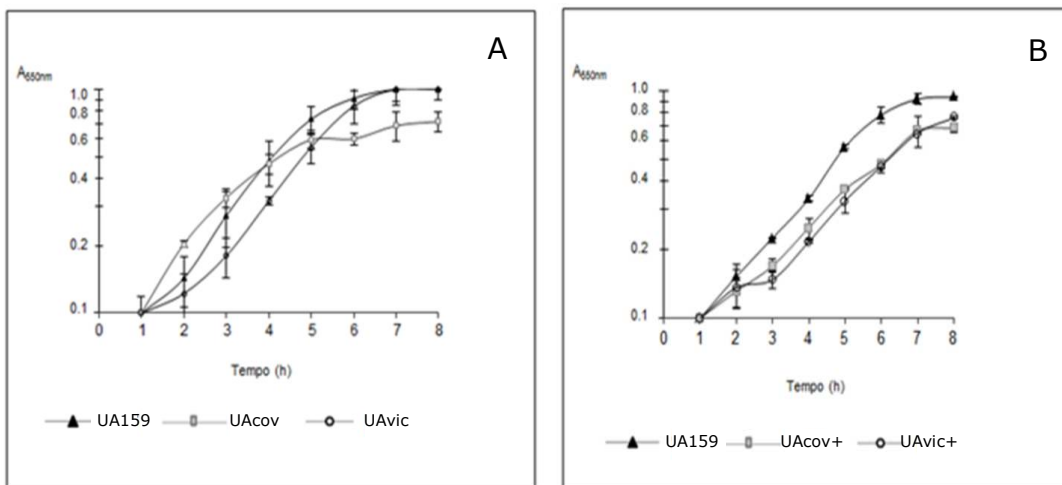


Figura 2: Curvas de crescimento das cepas *S. mutans* em BHI + 0,1% de sacarose (10% CO_2 , 37°C) acrescido de eritromicina (cepas mutantes e complementadas) e espectinomicina (cepas complementadas). A) Comparações das curvas das cepas mutantes UAcov (*covR*-) e UAvic (*vick*-) com a da cepa selvagem UA159 não indicam diferenças significativas. B) Comparações das curvas das cepas complementadas UAcov+ e UAvic+ com a da cepa selvagem. Os símbolos representam médias de três experimentos independentes realizados em duplicada; as barras indicam os desvios padrão.

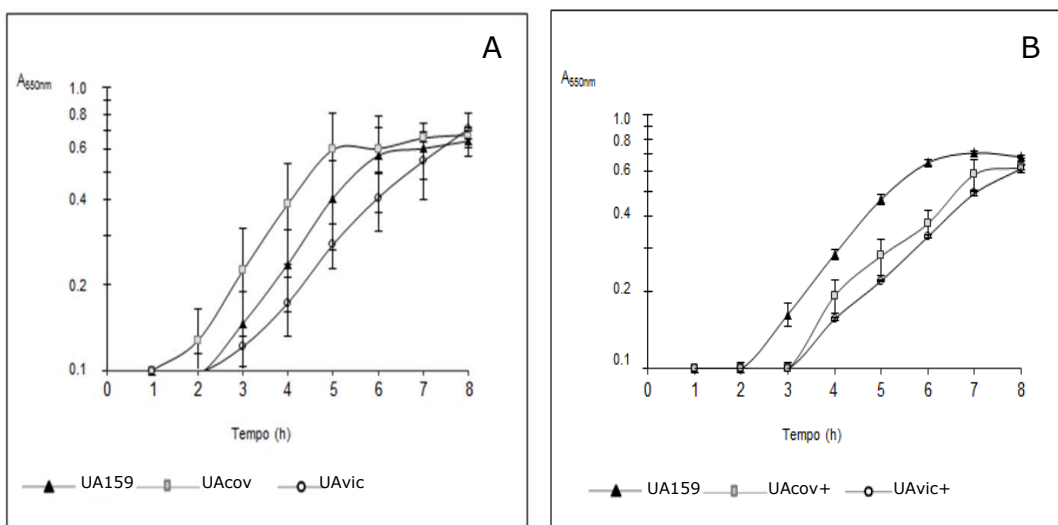


Figura 3: Curvas de crescimento das cepas *S. mutans* em RPMI (10% CO_2 , 37°C) acrescido de eritromicina (cepas mutantes e complementadas) e espectinomicina (cepas complementadas). A) Comparações das curvas das cepas mutantes UAcov (*covR*) e UAvic (*vick*-) com a da cepa selvagem UA159 não indicam diferenças significativas. B) Comparações das curvas das cepas complementadas UAcov+ e UAvic+ com a da cepa selvagem. Os símbolos representam médias de três experimentos independentes realizados em duplicada; as barras indicam os desvios padrão.

Para nos certificarmos que a incubação das cepas com 20% de soro humano por 30 min. não promovia a lise bacteriana, amostras de cepas incubadas ou não com soro foram plaqueadas em BHA contendo ou não eritromicina e/ou espectinomicina e o número de ufc/ml determinado após 48 h de incubação. Não foram detectadas variações significativas nos números de ufc/ml entre as cepas incubadas ou não com soro.

5.2 A inativação de *covR* e *vicRK* inibe significativamente a deposição de C3b/iC3b do complemento sobre a superfície de *S. mutans* na presença ou não de sacarose

Neste estudo, verificamos que a inativação de *covR* e *vicK* diminui em torno de 3 vezes a deposição de C3b a superfície de *S. mutans* na presença de soro, quando comparado com a cepa selvagem UA159. Como ilustrado na Figura 4, houve uma média de deposição de C3b de 23,5% na cepa selvagem UA159, enquanto que nos mutantes UA_{cov} e UA_{vic}, a deposição caiu para 10,47 e 7,6%, respectivamente. A complementação dos mutantes com cópia intacta do gene inativado restaurou a deposição de C3b a níveis semelhantes ao da cepa selvagem, confirmando a influência destes sistemas reguladores nos fenótipos de deposição de C3b (Figura 4).

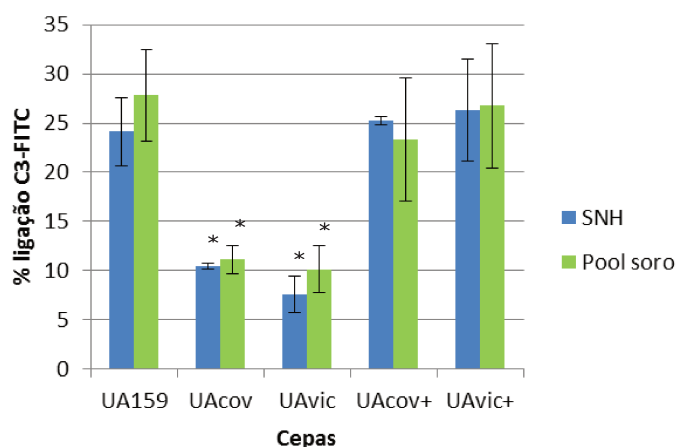


Figura 4: Porcentagem de ligação de C3b/iC3b à superfície das cepas de UA159, mutantes UA_{cov}, UA_{vic} e mutantes complementados UA_{cov}+, UA_{vic}+, na presença de soro normal humano (SNH) de 1 voluntário (azul) e na presença de *pool* de soro de 6 voluntários (verde). As colunas representam médias de três experimentos independentes realizados em triplicata. As barras indicam os desvios padrão. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA seguido de Tukey: **p* < 0,001 em relação à UA159.

A comparação da deposição de C3b em *S. mutans* UA159 foi significativamente menor em células cultivadas em BHI com 0,1% de sacarose comparado ao mesmo meio sem sacarose (Figura 5). A deposição de C3b à superfície de UA159 na presença de sacarose caiu para 10,86%, e para os mutantes UAcov e UAvic foi reduzida a 6,6 e 3,96%, respectivamente. Estes resultados provavelmente resultam da síntese de polissacarídeos de superfície insolúveis em água a partir da sacarose pelas enzimas Gtfs. Os glucanos são considerados o fator de virulência central para a formação de biofilmes dentários de biomassa suficiente para induzir a desmineralização dos dentes. Neste estudo, mostramos que os glucanos adsorvidos à superfície interferem na deposição do complemento. Para isto, comparamos a deposição C3b entre células UA159 crescidas em BHI com 0,1% sacarose tratadas ou não com HCl a 0,5M (para solubilização de glucanos de superfície), e verificamos que a deposição de C3b foi restaurada (% média de deposição de C3b; $22,3 \pm 6,0$) a níveis semelhantes aos da cepa UA159 crescida em BHI sem este açúcar (dados não mostrados).

Os sistemas VicRK e CovR induzem e reprimem respectivamente a expressão de genes que codificam as Gtfs, as quais sintetizam glucanos. O mutante UAcov, o qual tem produção elevada de Gtfs (Stipp *et al.*, 2013) é capaz de produzir glucanos de superfície mesmo em meio BHI sem sacarose, uma vez que este meio pode conter elementos traço de sacarose (dados não mostrados). Assim, a deposição de C3b em UAcov é significativamente menor do que a cepa selvagem independentemente da adição de 0,1% de sacarose ao meio (Figura 5). O mutante UAvic, o qual apresenta quantidade cerca de 10 vezes menor de Gtf de superfície comparado a UA159 (Stipp *et al.*, 2013), sofreu significativa redução na deposição de C3b em relação à UA159 em ambas as condições. Como esperado, a complementação das cepas mutantes restaurou a deposição de C3b a níveis semelhantes ao da cepa selvagem.

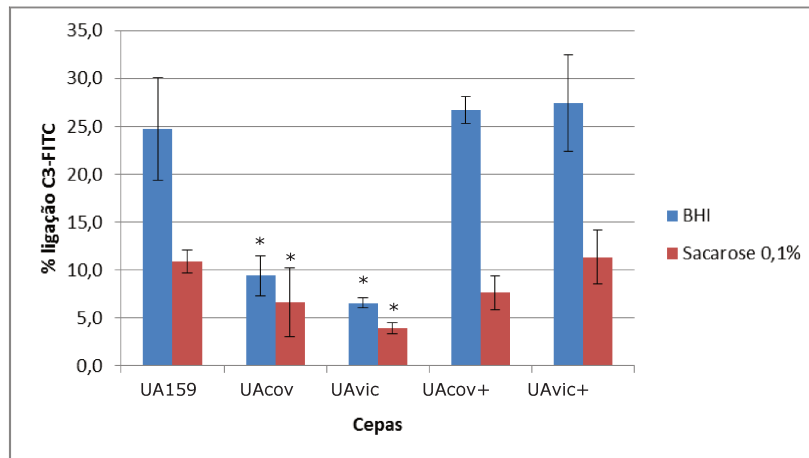


Figura 5: Porcentagem de ligação de Cb3/iC3b à superfície das cepas de UA159, mutantes UAcov, UAvic e mutantes complementados UAcov+, UAvic+. Análise da deposição do complemento em cepas *S. mutans* cultivadas ou não na presença de sacarose. As colunas representam médias de três experimentos independentes realizados em triplicata. As barras indicam os desvios padrão. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA seguido de Tukey: * $p < 0,001$ em relação à UA159.

5.3 A diminuição da deposição do complemento sobre os mutantes *covR* e *vicK* envolve as via clássica (dependente de anticorpo) e alternativa (independente de anticorpo) de ativação do complemento

A diminuição da deposição de C3b sobre a superfície dos mutantes *covR* e *vicK* ocorre na presença e ausência de C1q, fator do complemento envolvido na ativação da via clássica do sistema complemento, isto é de forma dependente de anticorpos opsonizantes das classes IgG e IgM (Figura 6). Como mostrado na Figura 6, a presença de C1q é muito importante na deposição de C3b, uma vez que soro sem C1q (Figura 6B) há drástica redução da deposição de C3b/iC3b sobre SM. Entretanto, mesmo na ausência de C1q, os mutantes UAcov e UAvic apresentam deposição significativamente menor de C3b/iC3b na superfície, comparadas à cepa selvagem UA159, indicando que estes mutantes são menos susceptíveis a deposição do complemento por vias de ativação independentes de C1q (Figura 6B).

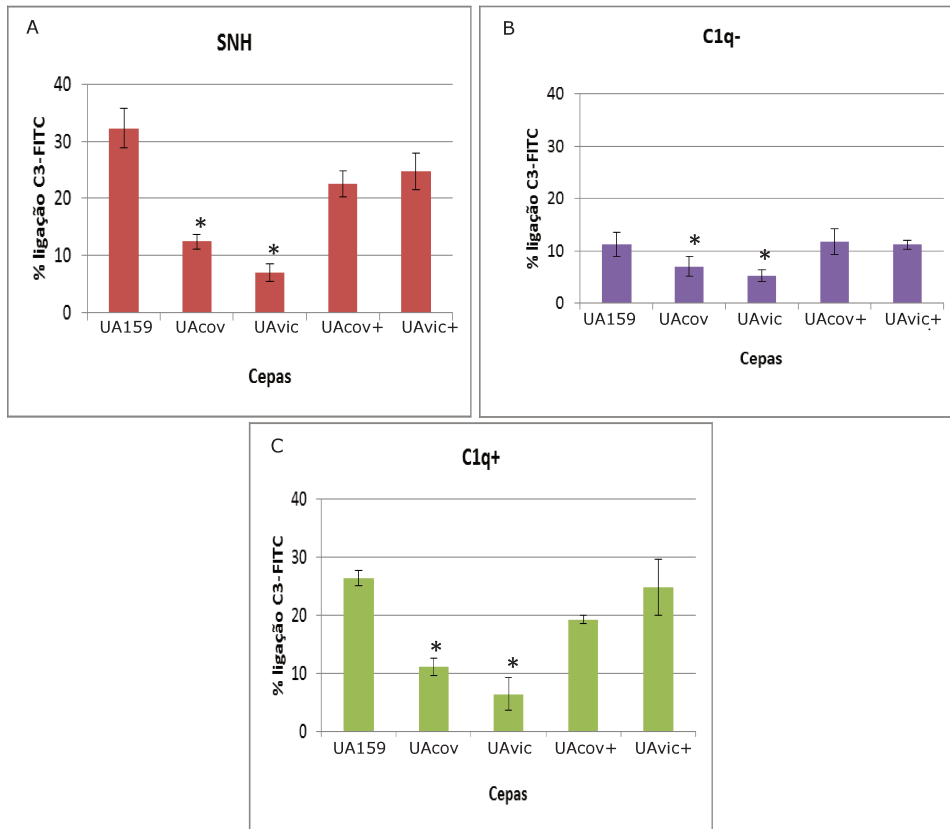


Figura 6: Porcentagem de ligação de C3b/iC3b sobre a superfície das cepas UA159, dos mutantes UAcov, UAvic e dos complementados UAcov+, UAvic+ na presença de: (A) SNH (soro normal humano), (B) soro desprovido de C1q (C1q-) e), (C) soro desprovido de C1q suplementado com C1q purificado (C1q+), todos na concentração de 20%. Ensaio realizado para investigar quais as vias de ativação do complemento que as cepas estão envolvidas, se na via clássica (dependente de anticorpo) ou alternativa (independente de anticorpo). Todos os dados foram analisados pelo teste t, * $p < 0,05$ em relação à UA159.

A quantificação dos anticorpos reativos contra cepas SM nas amostras de soro foi realizada com anticorpos anti-IgG e anti-IgM humano (Figura 7). Os mutantes *covR* e *vicK* tiveram menor deposição de anticorpos dos isotipos IgG e IgM do que a cepa selvagem UA159, compatível com os dados da Figura 6.

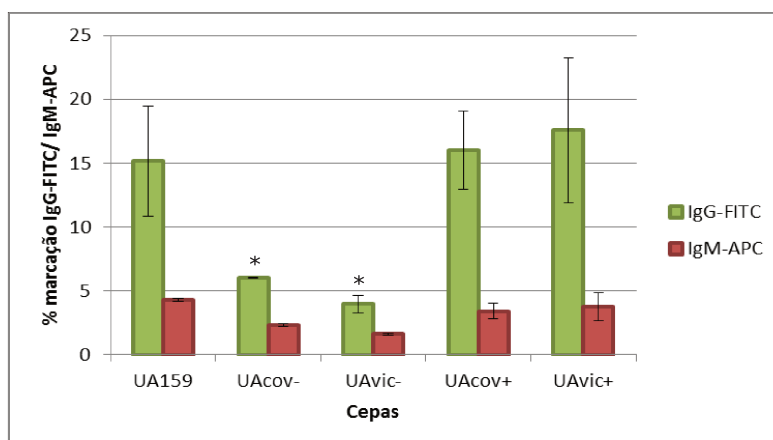


Figura 7: Quantificação do reconhecimento das cepas *S. mutans* por anticorpos séricos dos isotipos IgG e IgM através de citometria de fluxo. As colunas representam médias de três experimentos independentes realizados em triplicata. As barras indicam os desvios padrão. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA seguido de Tukey: * $p < 0,001$ em relação à UA159.

5.4 Os mutantes UAvic e UAcov são menos susceptíveis à fagocitose por PMNs na presença de soro

Para analisar a frequência de fagocitose por PMN nas condições de deposição do complemento, PMN foram isolados do sangue de voluntários, com pureza superior a 95%, quando analisados por citometria de fluxo (Figura 8). A seguir, estas células foram expostas às diferentes cepas marcadas com FITC, para determinação da fagocitose. Como ilustrado na Figura 9, a porcentagem de marcação bacteriana com FITC variou entre 84 e 94,8 % para todas as cepas testadas.

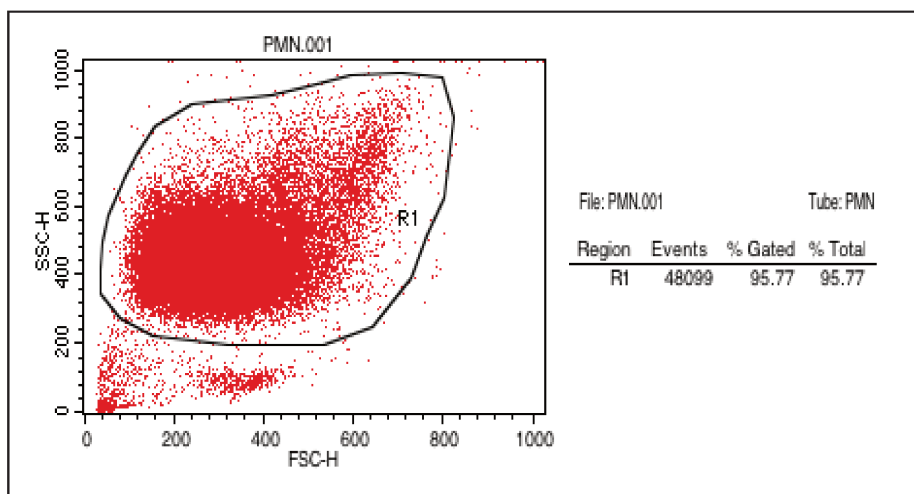


Figura 8: Isolamento de PMNs do sangue de um voluntário. Determinação da pureza de 95.77% pela análise das células isoladas através das características de tamanho (FSC) e complexidade (SSC) por citometria de fluxo.

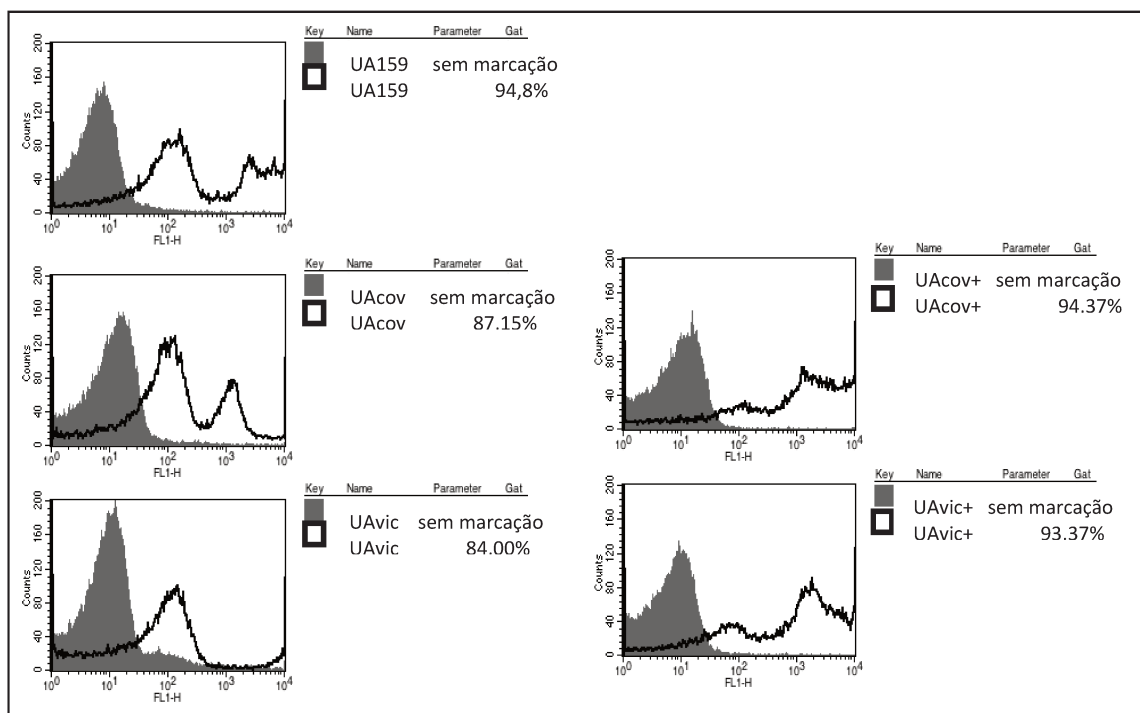


Figura 9: Histogramas e porcentagem de marcação bacteriana com FITC (1 mg/ml), nas cepas SM UA159, UAcov, UAvic, UAcov+ e UAvic+ determinadas em citômetro de fluxo. As áreas em cinza representam as bactérias não marcadas e as linhas em preto representam bactérias marcadas com FITC.

Ensaio preliminares de fagocitose foram realizados com as MOIs de 20:1 (dados não mostrados) e 200:1 (Figura 10). A partir destes ensaios, verificou-se que a MOI 200:1 resultou na maior porcentagem de fagocitose na cepa selvagem UA159 durante 5 e 30 min. de incubação com PMN (cerca de 75 a 80% dos PMN com bactérias internalizadas). Assim, esta MOI foi utilizada nos experimentos seguintes.

Compatível com os dados de marcação por C3b, os mutantes UAvic e UAcov foram significativamente menos fagocitados por PMN, quando comparados com as cepa selvagem e mutantes complementados durante 5 a 30 min. na presença de 20% de soro humano (Figuras 10A). Estes dados são ainda consistentes com estudos de fagocitose por PMN destas cepas em outras condições experimentais (Negrini *et al.*, 2012). Os valores percentuais de fagocitose de cada cepa são representados pelos histogramas na Figura 11.

Para investigar o efeito de componentes do soro na frequência de fagocitose, ensaios semelhantes foram realizados na ausência do soro humano. Como mostrado na Figura 10B, na ausência do soro, a porcentagem de fagocitose foi muito baixa 28 a 10% em todas as cepas testadas, indicando que a fagocitose bacteriana por PMN nas condições estudadas é dependente de componentes do soro.

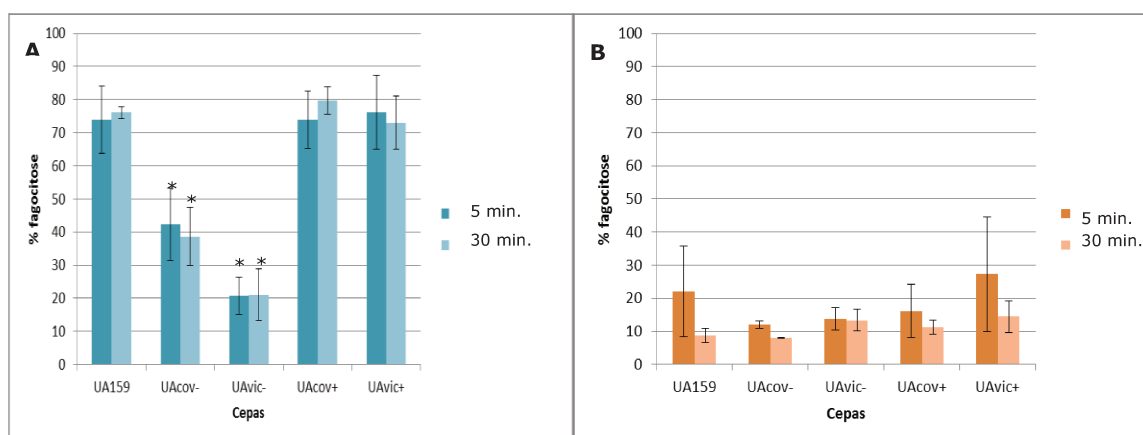


Figura 10: Porcentagens de fagocitose de PMN com cepas de SM internalizadas na MOI 200:1 nos tempos de 5 e 30 minutos. A fagocitose foi avaliada em duas condições: (A) presença do soro e (B) ausência do soro (PBS). As colunas representam a média de três experimentos independentes. Barras indicam os desvios padrão. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa em relação à UA159. Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste de Tukey * $p < 0,001$.

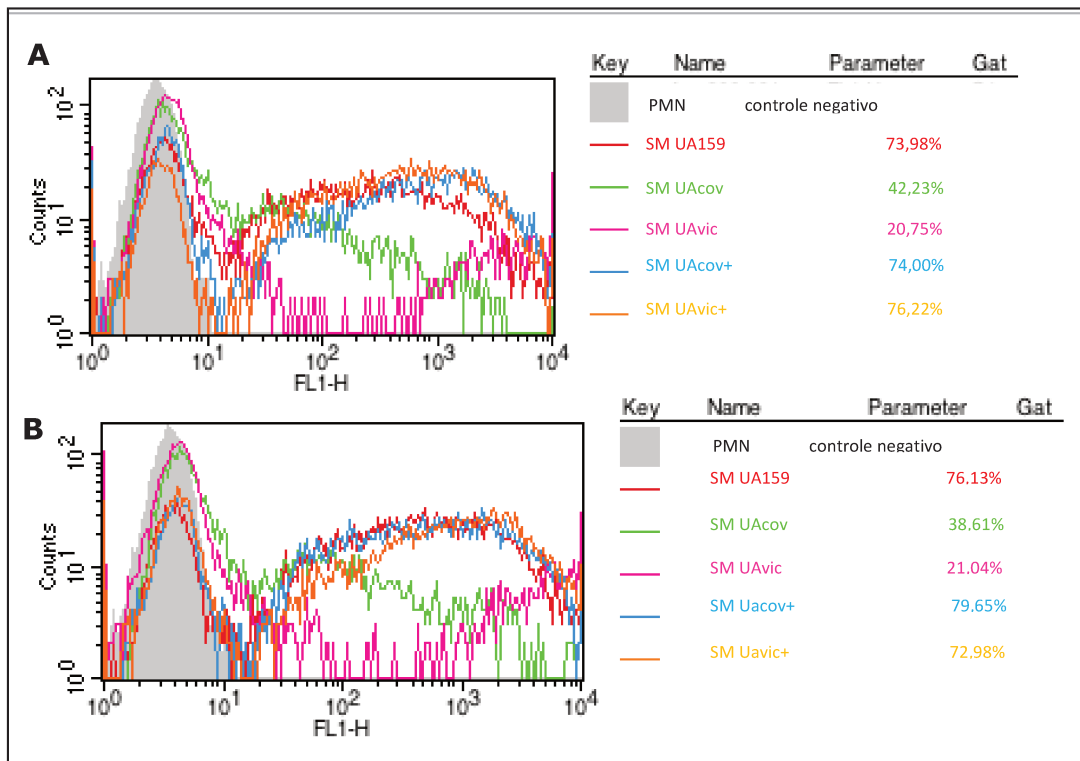


Figura 11: Representação gráfica em histograma da frequência de fagocitose das cepas SM UA159, UAcov, UAvic, UAcov+ e UAvic+ por PMN (controle negativo) nos tempos exposição de 5 (A) e 30 (B) min.

6 DISCUSSÃO

6.1 Os fatores regulados pelos sistemas CovR e VicRK interferem na marcação pelo sistema complemento

Uma das principais estratégias bacterianas para evasão do complemento consiste no escape à deposição de C3b através da inibição da convertase de C3 ou lise de C3b (Lambris *et al.*, 2008). Patógenos do gênero *Streptococcus* apresentam diversos componentes de escape ao sistema complemento que impedem a deposição de C3b/iC3b decorrentes da via clássica e alternativa de ativação do complemento à superfície bacteriana (Mitchell, 2003; Hyams *et al.*, 2010). Além disso, proteínas da superfície de estreptococos que se ligam aos componentes do sangue do hospedeiro (por exemplo, fibrinogênio, albumina e proteínas reguladoras solúveis do complemento) favorecem o escape à opsonização por C3b (Mitchell, 2003). Em *S. pneumoniae*, foi demonstrado que a inativação de genes que codificam enzimas de biogênese de parede celular, como as hidrolases de mureína LytB e LytC (*lytB* e *lytC*, respectivamente) aumenta a deposição de C3b, o que indica papel importante destas autolisinas na resistência de *S. pneumoniae* à marcação pelo complemento (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). Dois SDC, VicRK e CovR regulam hidrolases de mureína e outras proteínas de biogênese da parede celular em *S. mutans*, VicRK e CovR (Stipp *et al.*, 2013).

Os fatores regulados pelos sistemas CovR e VicRK que interferem nesta marcação precisam ser identificados. Em UA159, demonstramos recentemente que a inativação de *covR* em UA159, aumenta a expressão de diversas proteínas envolvidas na biogênese da parede celular (Stipp *et al.*, 2013). É possível, portanto, que algumas destas proteínas estejam implicadas no escape à opsonização pelo complemento, como verificado para LytB/C em *S. pneumoniae*. A inativação de *vicK* também promove forte aumento na expressão da hidrolase de mureína *smaA* (cerca de 16 vezes) (Stipp *et al.*, 2013). A mesma proteína é super-expressa em cerca de 15 vezes em UAcov. A análise da deposição de C3b

no mutante *smaA*, assim como em mutantes de outras proteínas de parede celular super-expressas em UAvic poderão revelar participação destas proteínas no escape ao complemento. Verificamos ainda no genoma de UA159, um gene que codifica uma protease de C3. Embora a transcrição deste gene não tenha sido alterada em UAcov ou UAvic em meio BHI (Stipp *et al.*, 2013), a análise da expressão deste gene em UA159, UAvic e UAcov em resposta ao contato com soro humano precisa ser investigada.

Na espécie *S. pneumoniae* variações na síntese de diferentes tipos de cápsula polissacarídica são reconhecidas como um dos principais fatores de escape à opsonização (Hyams *et al.*, 2013). A formação do biofilme evita a deposição de C3b e fagocitose em *S. pneumoniae* (Domenech *et al.*, 2013). Em *S. mutans* o SDCs VicRK e CovR é requerido para formação de biofilme (Duque *et al.*, 2011; Stipp *et al.*, 2013). Os nossos resultados indicam que a síntese de glucanos insolúveis a partir da sacarose, não apenas é fundamental para a formação de biofilmes dentários, mas também é um fator de escape ao sistema complemento importante em casos de bacteremias de origem oral. Na presença de sacarose, as cepas de SM UA159 foram significativamente menos opsonizadas pelo sistema complemento, comparadas às cepas crescidas na ausência deste açúcar (Figura 5). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que investiga o efeito da síntese de glucanos de *S. mutans* no escape deste microrganismo ao sistema complemento.

6.2 O SDC VicRK e CovR regulam proteínas de superfície que podem agir como fatores antiopsonizantes e antifagocíticos

Uma variedade de espécies bacterianas ou extratos de parede celular podem ativar o sistema complemento pelas vias clássica e/ou alternativa (Winstel, Xia, Peschel, 2013). Peptideoglicano (ou mureína) é um polímero estrutural rígido formado por cadeias de açúcar formadas por unidades dissacarídicas de ácido-N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina interligada por peptídeos curtos que se ligam aos grupos lactil do ácido-N-acetil-murâmico comum em todas as bactérias

(Madigan, Martinko, Dunlap, 2010). Fragmentos de mureína são conhecidos por ativarem a via clássica/alternativa (Greenblatt, Boackle, Schwab, 1978). Entretanto, as vias predominantes de ativação de complemento parecem diferir entre gêneros e espécies de bactérias (Forsgren & Quie, 1974). Peptideoglicano e parede celular de *Actinomyces viscosus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do grupo A foram comparados na sua habilidade de ativar a via alternativa do complemento. O peptideoglicano de *A. viscosus* foi 3,5 vezes mais ativador que o peptideoglicano de *Streptococcus* do grupo A (GAS) e 15,6 vezes mais ativador comparado ao de *S. aureus* (Baker & Billy, 1983).

O tratamento de peptideoglicano de GAS com mutanolisina, uma enzima hidrolítica da parede celular, compromete a capacidade deste polímero em ativar as vias clássica e alternativa do sistema complemento de soro humano, e esta perda de ativação é acompanhada da extensa degradação do peptideoglicano, em que tamanhos pequenos são menos ativadores, quando comparado a tamanhos maiores (Janusz, Eisenberg, Schwab, 1987). Assim o peptideoglicano de bactérias Gram-positivas difere em propriedade de ativação do complemento dependendo de sua composição e do tamanho molecular. Os SDC VicRK e CovR regulam diversas funções de síntese e degradação de peptideoglicano (Duque *et al.*, 2011; Stipp *et al.*, 2013), o que poderia alterar a composição da parede celular e favorecer a liberação de muropeptídeos (Stipp *et al.*, 2013), os quais poderiam interferir na ativação do sistema complemento em soro humano.

A expressão reduzida de hidrolases de mureína em UAvic, poderia explicar o tamanho extremamente longo das cadeias de cocos típicos deste mutante, os quais não completam a separação dos septos de divisão (Duque *et al.*, 2011; Stipp *et al.*, 2013). Entretanto, apesar da formação de cadeias longas aparentemente favorecer a deposição do sistema complemento (Weiser, 2013), o mutante UAvic é significativamente menos marcado por C3b/iC3b comparado à cepa selvagem UA159. A baixa expressão de *gtfB/C* e conseqüentemente menor produção de glucanos de superfície, também deveria favorecer a deposição de

C3b/iC3b sobre UAvic. Por outro lado, o mutante UAvic é significativamente menos marcado por C3b do que a cepa selvagem. Em *Staphylococcus aureus* o ortólogo de VicRK (WalkR) regula a liberação de fragmentos de peptidoglicano que induzem a resposta inflamatória (Delauné *et al.*, 2012). Este sistema foi estudado na patogênese e resposta imune inata usando modelos de infecção murinos e em sangue humano, mostrando que este sistema tem um importante papel na virulência, por desencadear a resposta imune inflamatória (Delauné *et al.*, 2012). Possivelmente, o sistema VicRK em *S. mutans* regule fatores de virulência relacionados com a resposta imune, visto que na ausência deste sistema em SM, as cepas foram menos opsonizadas pelo sistema complemento e anticorpos IgG.

Embora a estrutura de peptidoglicano seja frequentemente referida como uma estrutura rígida em forma de sacúolo que envolve a membrana citoplasmática bacteriana, esta macromolécula é dinamicamente remodelada durante o crescimento e colonização bacteriana. Uma variedade de enzimas participa deste processo de remodelação, como as transglicosilases líticas, transpeptidases, carboxipeptidases, endopeptidases e muramidases (Boneca, 2005). Recentemente, foi identificado uma proteína endopeptidase O (PepO) em *S. pneumoniae* com capacidade de ligar-se ao plasminogênio e gerar uma plasmina capaz de clivar C3 e C5 do complemento (Agarwal *et al.*, 2013). Identificamos uma proteína ortóloga de PepO no genoma de SM UA159 codificada pelo gene *smu.2036* e com 67% de identidade da sequência de aminoácidos.

Estudos em *S. pneumoniae*, indicam que embora a cápsula seja um dos principais fatores de escape ao complemento, cepas não-encapsuladas também tem capacidade de escape à marcação pelo complemento (Dalia, Standish, Weiser, 2010). Em *S. pneumoniae* a autolisina LytA potencializa a deposição de C3b do complemento na presença de drogas antimicrobianas que atuam na parede celular, como antibióticos β -lactâmicos, por mecanismos ainda não bem

compreendidos (Ramos-Sevillano *et al.*, 2012). A inativação de enzimas líticas de glicoconjugados, como as neuraminidases, em *S. pneumoniae* promove significativo aumento na deposição do complemento em relação a cepas selvagens, possivelmente por clivar glicoproteínas humanas importantes para a ativação do sistema complemento (Dalia, Standish, Weiser, 2010). Uma vez que o sistema VicRK regula diversas enzimas líticas de superfícies de *S. mutans*, é possível que alterações em enzimas ainda não identificadas interfiram na ativação do sistema complemento em *S. mutans*. No mutante UAvic o gene *smu.2146c* é fortemente inibido. Este gene codifica uma proteína com domínio de transglicosilase SLT (*Soluble Lytic Transglycosylase*), uma típica proteína lítica que cliva ligações de mureína. O gene *smu.2146c* ainda forma um operon com *smu.2147c*, o qual foi designado *lysM*, uma vez que codifica uma proteína com domínio de lisina (domínio LysM) envolvido na ligação ao peptideoglicano e típico de autolisinas. Adicionalmente, a transcrição de *smaA*, o qual codifica uma autolisina, foi fortemente reprimido por VicRK (Stipp *et al.*, 2013). Assim, é possível que a expressão alterada de enzimas líticas de mureína em UAvic interfiram na liberação de fragmentos de peptideoglicano ativadores do complemento ou modifique a superfície de SM tornando-a menos susceptível à deposição de C3b/iC3b.

Nossos resultados mostram que a maior taxa de ativação do sistema complemento ocorreu pela via clássica (Figura 6). Em *S. pneumoniae*, a via clássica é a via mais importante de deposição de C3b/iC3b sobre as cepas de três sorotipos, como verificado em ensaios com soro normal e defectivo em C1q (primeira proteína da via clássica) ou em fator B (primeira proteína da via alternativa) (Yuste *et al.*, 2008). A via clássica ainda é dominante na ativação do sistema complemento para imunidade inata em infecções com *S. pneumoniae* em camundongos (Brown *et al.*, 2002). Por outro lado, análises de deposição de C3b em cepas *S. pyogenes* com soro normal ou soro defectivo em C1q ou Fator B demonstraram que a via alternativa é a mais importante na marcação de *S. pyogenes* por C3b, uma vez que a deposição de C3b a partir de soro sem C1q foi

semelhante à de soro normal na maioria das cepas (Yuste et al., 2006). Já em *Streptococcus suis*, a via alternativa parece ter papel importante na opsonização (Pian et al., 2012). Diferenças nas vias de ativação do complemento entre a espécie de *S. suis* pode ser devida à baixa taxa de infecção por *S. suis*, comparada a outras espécies. Assim, o sangue de doadores pode não conter anticorpos específicos contra *S. suis*, não predominando a ativação pela via clássica.

Em *S. pneumoniae* o sorotipo capsular e outros fatores ainda não identificados parecem influenciar na marcação por C3b/iC3 de forma independente da espessura e sorotipo da cápsula e da reatividade com anticorpos IgG e IgM (Hyams et al., 2011). As cepas mutantes *covR* e *vicK* foram menos reativas com anticorpos ativadores da via clássica (IgG e IgM), quando comparado à cepa SM UA159, mostrando que esses SDCs regulam a expressão de antígenos de superfície comumente reconhecidos por anticorpos opsonizantes do soro humano (Figura 7), o que indiretamente afeta a ativação do sistema complemento dependente da via clássica. Entretanto outros fatores além da reatividade com IgG e IgM parecem influenciar na deposição de C3b (Figura 6B). A reduzida expressão de proteínas de superfície altamente imunogênicas, como GbpB e Gtfs observada em UAvic (Duque et al., 2011), poderia explicar a menor reatividade deste mutante com anticorpos IgG/M. Entretanto, estas mesmas proteínas são super-expressas em UAcov.

Uma série de proteínas da superfície celular em bactérias patogênicas foi identificada como fatores antifagocíticos por inibir a atividade do complemento, como por exemplo, a proteína PspC em *Streptococcus pneumoniae* (Dave et al., 2004), as proteínas relacionadas com a proteína M e Scl1 em GAS (Perez-Caballero et al., 2004; Caswel et al., 2008) e, recentemente, foi identificada uma nova proteína de superfície Fhb (*factor H-Binding Protein*) que contribui para a capacidade antifagocítica e virulência de *Streptococcus suis* (Pian et al., 2012). Entretanto, o genoma de *S. mutans* UA159 não contém genes ortólogos destes fatores, embora tenhamos identificado um gene codificador de possível protease

de C3 e a protease PepO, os quais deverão ser caracterizado em trabalhos futuros. Além disto, é possível que alterações na expressão de proteínas de parede celular e/ou membrana nestes mutantes afetem a interação de *S. mutans* com outros componentes séricos solúveis como, por exemplo, fibrinogênio e plasminogênio.

6.3 Em *S. mutans* os fatores regulados por *covR* e *vicRK* que influenciam no escape ao sistema imune ainda são desconhecidos

Para GAS sorotipo M1T1 a mutação no SDC *covRS* promove resistência à fagocitose mediada por neutrófilos por meio da regulação positiva de *sda1* (*bacteriophage-encoded DNase*) (Sumbly *et al.*, 2006), além deste fator de virulência, outros fatores regulados por CovRS foram determinados, como a proteína M1 e genes de síntese da cápsula de ácido hialurônico (Cole *et al.*, 2010). Assim, foi demonstrado que a inativação de *covRS* aumenta a expressão *sda1*, da proteína M1 e dos genes de síntese de cápsula de ácido hialurônico, resultando no aumento da sobrevivência do sorotipo GAS M1T1 dentro de neutrófilos (Cole *et al.*, 2010). Assim como o SDC CovRS de GAS, o SDC VicRK e o regulador órfão CovR de *S. mutans* poderiam regular a expressão de fatores de escape à fagocitose. Diferente do estudo de Cole *et al.* (2010) em que as cepas mutantes de *covRS* em GAS M1T1 não demonstraram fagocitose reduzida por PMNs humanos, as cepas mutantes *covR* e *vicK* de SM são significativamente menos fagocitadas por PMN em sangue humano, compatível com a menor deposição de C3b/iC3b.

Até o momento, o SDC CovRS tinha sido descrito no escape a opsonização e fagocitose em GAS (Sumbly *et al.*, 2006; Cole *et al.*, 2010; Agrahari *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2013). Recentemente, foi demonstrado na cepa de GAS AP53, o papel de CovRS na opsonofagocitose por neutrófilos humanos e a regulação de fatores de virulência relacionados ao escape do sistema imune (Liang *et al.*, 2013). As cepas AP53 apresentam uma mutação do sensor CovS e são capazes de se ligar fortemente a proteínas reguladoras do complemento que

inibem a formação da C3-convertase, como o Fator H (FH) e a proteína de ligação a C4 (C4BP), as quais reduzem a deposição de C3b. Isto resulta numa menor morte bacteriana por neutrófilos humanos (Agrahari *et al.*, 2013). O efeito da mutação de CovS em GAS está associado com a expressão da protease extracelular, exotoxina pirogênica estreptocal B (SpeB), cápsula de ácido hialurônico e uma série de proteínas que permitem à plasmina do hospedeiro ligar-se à superfície bacteriana, como a proteína de alta afinidade ao plasminogênio (Pg)/ proteína receptora de plasmina, proteína M de ligação a Pg de *Streptococcus* do grupo A (PAM) e uma proteína estreptoquinase ativadora de Pg (Liang *et al.*, 2013). Neste trabalho demonstramos pela primeira vez que a deleção do regulador órfão CovR em *S. mutans* promove escape à opsonização pelo sistema complemento por mecanismos ainda desconhecidos.

6.4 Estudos e projetos futuros

O trabalho realizado proporcionou várias descobertas inéditas sobre possíveis fatores que regulam o escape de *S. mutans* ao sistema imune inato. Nosso trabalho mostrou que a inativação dos genes que compõem o SDC VicRK e CovR de *S. mutans* afetam a deposição do sistema complemento e fagocitose por PMN humanos de forma soro-dependente. Com base em estudos anteriores do nosso grupo, em que verificamos que este SDC regulam diversas proteínas de superfícies e genes de hidrolase de mureína, como os genes *wapE*, *lysM*, *2146c*, *smaA* e *epsC*, seguiremos nossos estudos investigando a marcação do componente C3b nas cepas mutantes destes genes, além de avaliar a expressão dos mesmos na presença de soro na cepa selvagem UA159 e respectivos mutantes *vick* e *covR*. A virulência dos mutantes UAvic e UAcov em modelos animais de endocardite bacteriana está em andamento em cooperação com o grupo do Dr. Kazuhiko Nakano (*Osaka University Graduate School of Dentistry*, Japão). Além disto, deveremos avaliar a diversidade de deposição de C3b/iC3b entre cepas *S. mutans* isoladas da cavidade bucal e de sangue em casos de bacteremia e/ou endocardite (cedidas gentilmente pela Dra. Satu Alaluusua, do

Instituto de Odontologia da Universidade de Helsinki, Helsínquia, Finlândia).
Mutantes *knock-out* dos genes que codificam a protease de C3 (SMU.399) e protease PepO (SMU.2036) em UA159 também serão construídos e caracterizados quanto à susceptibilidade à deposição do sistema complemento.

7 CONCLUSÕES

Como base nos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que:

- 1) A inativação dos sistemas VicRK e CovR reduz significativamente a deposição de C3b do sistema complemento humano por vias dependentes e independentes de anticorpos.
- 2) A síntese de polissacarídeos de superfície a partir da sacarose reduz significativamente a deposição de C3b em *S. mutans*.
- 3) Os mutantes *vicK* e *covR* são menos reativos com anticorpos séricos dos isotipos IgG e IgM.
- 4) Reduções da deposição de C3b nas cepas analisadas estão associadas à redução da frequência de fagocitose de forma soro-dependente.

REFERÊNCIAS

1. Abbas, A. K., Lichtman, A.H. *Imunologia Básica*. Editora Elsevier; 2007.
2. Abranches J, Nascimento MM, Zeng L, Browngardt CM, Wen ZT, Rivera MF, Burne RA. CcpA regulates central metabolism and virulence gene expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2008; 190(7):2340-9.
3. Agarwal V, Kuchipudi A, Fulde M, Riesbeck K, Bergmann S, Blom AM. *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells. *J Biol Chem*. 2013; 288(10):6849-63.
4. Agrahari G, Liang Z, Mayfield JA, Balsara RD, Ploplis VA, Castellino FJ. Complement-mediated opsonization of invasive group A *Streptococcus pyogenes* strain AP53 is regulated by the bacterial two-component cluster of virulence responder/sensor (CovRS) system. *J Biol Chem*. 2013; 88(38):27494-504.
5. Ahn SJ, Burne RA. The *atlA* operon of *Streptococcus mutans*: role in autolysin maturation and cell surface biogenesis. *J Bacteriol*. 2006; 188(19):6877-88.
6. Ahn SJ, Burne RA. Effects of oxygen on biofilm formation and the *AtIA* autolysin of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2007; 189(17):6293-302.
7. Alves AC, Nogueira RD, Stipp RN, Pampolini F, Moraes AB, Gonçalves RB, et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *J Med Microbiol*. 2009; 58(Pt 4):476-81.
8. Baker JJ, Billy SA. Activation of the alternate complement pathway by peptidoglycan of *Actinomyces viscosus*, a potentially pathogenic oral bacterium. *Arch Oral Biol*. 1983; 28(11):1073-5.

9. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(2):89-99.
10. Biswas I, Drake L, Erkina D, Biswas S. Involvement of sensor kinases in the stress tolerance response of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2008; 190(1):68-77.
11. Biswas I, Drake L, Biswas S. Regulation of *gbpC* expression in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2007; 189(18):6521-31.
12. Biswas S, Biswas I. Regulation of the glucosyltransferase (*gtfBC*) operon by *CovR* in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2006; 188(3):988-98.
13. Boneca IG. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8(1):46-53.
14. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011; 45(1):69-86.
15. Brown JS, Hussell T, Gilliland SM, Holden DW, Paton JC, Ehrenstein MR, et al. The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(26):16969-74.
16. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res.* 1993; 72(1):37-45.
17. Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun.* 2000; 68(7):4018-23.
18. Chong P, Drake L, Biswas I. Modulation of *covR* expression in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol.* 2008; 190(13):4478-88.

19. Chia JS, Lee YY, Huang PT, Chen JY. Identification of stress-responsive genes in *Streptococcus mutans* by differential display reverse transcription-PCR. *Infect Immun.* 2001; 69(4):2493-501.
20. Claverys JP, Prudhomme M, Mortier-Barrière I, Martin B. Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol Microbiol.* 2000; 35(2):251-9.
21. Cole JN, Pence MA, von Kückritz-Blickwede M, Hollands A, Gallo RL, Walker MJ et al. M protein and hyaluronic acid capsule are essential for in vivo selection of covRS mutations characteristic of invasive serotype M1T1 group A *Streptococcus*. *MBio.* 2010; 1(4). pii: e00191-10.
22. Dalia AB, Standish AJ, Weiser JN. Three surface exoglycosidases from *Streptococcus pneumoniae*, NanA, BgaA, and StrH, promote resistance to opsonophagocytic killing by human neutrophils. *Infect Immun.* 2010; 78(5):2108-16.
23. Dave S, Pangburn MK, Pruitt C, McDaniel LS. Interaction of human factor H with PspC of *Streptococcus pneumoniae*. *Indian J Med Res.* 2004; 119 Suppl:66-73.
24. Delauné A, Dubrac S, Blanchet C, Poupel O, Mäder U, Hiron A, et al. The WalkR system controls major staphylococcal virulence genes and is involved in triggering the host inflammatory response. *Infect Immun.* 2012; 80(10):3438-53.
25. Díaz S, Fargione J, Chapin FS 3rd, Tilman D. Biodiversity loss threatens human well-being. *PLoS Biol.* 2006; 4(8):e277.
26. Domenech M, Ramos-Sevillano E, García E, Moscoso M, Yuste J. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2013; 81(7):2606-15.
27. Duque C, Stipp RN, Wang B, Smith DJ, Höfling JF, Kuramitsu HK et al. Downregulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm

formation and cell surface characteristics of *Streptococcus mutans*. Infect Immun. 2011; 79(2):786-96.

28. Falk P, Roth KA, Borén T, Westblom TU, Gordon JI, Normark S. An in vitro adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993; 90(5):2035-9.
29. Forsgren A, Quie PG. Influence of the alternate complement pathway in opsonization of several bacterial species. Infect Immun. 1974; 10(2):402-4.
30. Gosink KK, Mann ER, Guglielmo C, Tuomanen EI, Masure HR. Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2000; 68(10):5690-5.
31. Graham MR, Smoot LM, Migliaccio CA, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF, et al. Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and in vivo infection modeling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(21):13855-60.
32. Graham MR, Virtaneva K, Porcella SF, Barry WT, Gowen BB, Johnson CR, et al. Group A *Streptococcus* transcriptome dynamics during growth in human blood reveals bacterial adaptive and survival strategies. Am J Pathol. 2005; 166(2):455-65.
33. Greenblatt J, Boackle RJ, Schwab JH. Activation of the alternate complement pathway by peptidoglycan from streptococcal cell wall. Infect Immun. 1978; 19(1):296-303.
34. Gryllos I, Cywes C, Shearer MH, Cary M, Kennedy RC, Wessels MR. Regulation of capsule gene expression by group A *Streptococcus* during pharyngeal colonization and invasive infection. Mol Microbiol. 2001; 42(1):61-74.

35. Gryllos I, Grifantini R, Colaprico A, Jiang S, Deforce E, Hakansson A, et al. Mg(2+) signalling defines the group A *Streptococcal* CsrRS (CovRS) regulon. *Mol Microbiol.* 2007; 65(3):671-83.
36. Gryllos I, Tran-Winkler HJ, Cheng MF, Chung H, Bolcome R 3rd, Lu W, Lehrer RI, et al. Induction of group A *Streptococcus* virulence by a human antimicrobial peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(43):16755-60.
37. Haas KM, Hasegawa M, Steeber DA, Poe JC, Zabel MD, Bock CB, et al. Complement receptors CD21/35 link innate and protective immunity during *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating IgG3 antibody responses. *Immunity.* 2002; 17(6):713-23.
38. Herzberg MC, Nobbs A, Tao L, Kilic A, Beckman E, Khammanivong A, et al. Oral streptococci and cardiovascular disease: searching for the platelet aggregation-associated protein gene and mechanisms of *Streptococcus sanguis*-induced thrombosis. *J Periodontol.* 2005; 76(11 Suppl):2101-5.
39. Hohwy J, Reinholdt J, Kilian M. Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. *Infect Immun.* 2001; 69(10):6055-63.
40. Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun.* 2010; 78(2):704-15.
41. Hyams C, Opel S, Hanage W, Yuste J, Bax K, Henriques-Normark B, et al. Effects of *Streptococcus pneumoniae* strain background on complement resistance. *PLoS One.* 2011; 6(10):e24581.
42. Idone V, Brendtro S, Gillespie R, Kocaj S, Peterson E, Rendi M, et al. Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis. *Infect Immun.* 2003; 71(8):4351-60.

43. Janusz MJ, Eisenberg RA, Schwab JH. Effect of muralytic enzyme degradation of streptococcal cell wall on complement activation *in vivo* and *in vitro*. *Inflammation*. 1987; 11(1):73-85.
44. Jansen MAK, Gaba V, Greenberg BM. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends in Plant Sci*. 1998; 3: 131–135.
45. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005; 13(12):589-95.
46. Jorge, A.O.C. Princípios da microbiologia e imunologia. Editora Santos; 2010.
47. Jung CJ, Zheng QH, Shieh YH, Lin CS, Chia JS. *Streptococcus mutans* autolysin AtlA is a fibronectin-binding protein and contributes to bacterial survival in the bloodstream and virulence for infective endocarditis. *Mol Microbiol*. 2009; 74(4):888-902.
48. Kang YS, Do Y, Lee HK, Park SH, Cheong C, Lynch RM, et al. A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell*. 2006; 125(1):47-58.
49. Kreth J, Merritt J, Qi F. Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA Cell Biol*. 2009; 28(8):397-403.
50. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007; 71(4):653-70.
51. Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, et al. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol*. 2002; 184(10):2699-708.
52. Liang Z, Zhang Y, Agrahari G, Chandrabhas V, Glinton K, Donahue DL, et al. A natural inactivating mutation in the CovS component of the CovRS regulatory

- operon in a pattern D *Streptococcal pyogenes* strain influences virulence-associated genes. J Biol Chem. 2013; 288(9):6561-73.
53. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Microbiologia de Brock. 12. ed., Porto Alegre: Artmed; 2010.
54. Marsh P, Martin P. Microbiologia oral. São Paulo: Editora Santos, 4^o Edição; 2005.
55. Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ. Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. Infect Immun. 2001; 69(11):6931-41.
56. Mattos-Graner RO, Porter KA, Smith DJ, Hosogi Y, Duncan MJ. Functional analysis of glucan binding protein B from *Streptococcus mutans*. J Bacteriol. 2006; 188(11):3813-25.
57. Mereghetti L, Sitkiewicz I, Green NM, Musser JM. Extensive adaptive changes occur in the transcriptome of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) in response to incubation with human blood. PLoS One. 2008; 3(9):e3143.
58. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. Nat Rev Microbiol. 2003; 1(3):219-30.
59. Milgrom P, Riedy CA, Weinstein P, Tanner AC, Manibusan L, Bruss J. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hypoplasia, diet, and oral hygiene in 6- to 36-month-old children. Community Dent Oral Epidemiol. 2000; 28(4):295-306.
60. Nicolas GG, Lavoie MC. *Streptococcus mutans* and oral streptococci in dental plaque. Can J Microbiol. 2011; 57(1):1-20.

61. Nakano K, Matsumura M, Kawaguchi M, Fujiwara T, Sobue S, Nakagawa I, et al. Attenuation of glucan-binding protein C reduces the cariogenicity of *Streptococcus mutans*: analysis of strains isolated from human blood. J Dent Res. 2002; 81(6):376-9.
62. Nakano K, Tsuji M, Nishimura K, Nomura R, Ooshima T. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans* to bacteremia. Microbes Infect. 2006; 8(1):114-21.
63. Nakano K, Ooshima T. Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. Future Microbiol. 2009; 4(7):891-902.
64. Nakano K, Nemoto H, Nomura R, Homma H, Yoshioka H, Shudo Y, Hata H, et al. Serotype distribution of *Streptococcus mutans* a pathogen of dental caries in cardiovascular specimens from Japanese patients. J Med Microbiol. 2007; 56(Pt 4):551-6.
65. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. J Clin Microbiol. 2004; 42(1):198-202.
66. Negrini TC, Duque C, Vizoto NL, Stipp RN, Mariano FS, Höfling JF, et al. Influence of VicRK and CovR on the interactions of *Streptococcus mutans* with phagocytes. Oral Dis. 2012; 18(5):485-93.
67. Ng WL, Tsui HC, Winkler ME. Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol. 2005; 187(21):7444-59.
68. Nomura R, Nakano K, Ooshima T. Contribution of glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans* to bacteremia occurrence. Arch Oral Biol. 2004; 49(10):783-8.

69. Nomura R, Nakano K, Nemoto H, Fujita K, Inagaki S, Takahashi T, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. *J Med Microbiol.* 2006; 55(Pt 8):1135-40.
70. Paik S, Senty L, Das S, Noe JC, Munro CL, Kitten T. Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun.* 2005; 73(9):6064-74.
71. Parsek MR, Singh PK. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57:677-701.
72. Pérez-Caballero D, García-Laorden I, Cortés G, Wessels MR, de Córdoba SR, Albertí S. Interaction between complement regulators and *Streptococcus pyogenes*: binding of C4b-binding protein and factor H/factor H-like protein 1 to M18 strains involves two different cell surface molecules. *J Immunol.* 2004; 173(11):6899-904.
73. Pian Y, Gan S, Wang S, Guo J, Wang P, Zheng Y, et al. Fhb, a novel factor H-binding surface protein, contributes to the antiphagocytic ability and virulence of *Streptococcus suis*. *Infect Immun.* 2012; 80(7):2402-13.
74. Raghavan V, Groisman EA. Orphan and hybrid two-component system proteins in health and disease. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13(2):226-31.
75. Ramos-Sevillano E, Moscoso M, García P, García E, Yuste J. Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* 2011; 6(8):e23626.
76. Ramos-Sevillano E, Rodríguez-Sosa C, Díez-Martínez R, Giménez MJ, Olmedillas E, García P, et al. Macrolides and β -lactam antibiotics enhance C3b deposition on the surface of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains by a LytA autolysin-dependent mechanism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(11):5534-40.

77. Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2007; 25(11):1265-75.
78. Rudney JD, Chen R, Zhang G. Streptococci dominate the diverse flora within buccal cells. *J Dent Res.* 2005; 84(12):1165-71.
79. Sato Y, Yokoyama A, Shibata K, Akimoto Y, Ogino S, Nodasaka Y, et al. Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 in vitro and subcutaneous tissue of rats *in vivo*. *Mol Biosyst.* 2005; 1(2):176-82.
80. Schachtele CF, Nobbs AH, Zhang Y, Costalonga M, Herzberg MC. Oral streptococci: commensals and opportunistic pathogens. In *Molecular Biology of Streptococci*. Edited by R. H. S. Chhatwal. Norfolk, UK: Horizon Bioscience. 2007, p. 411–462.
81. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DC, et al. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *ftf* expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol.* 2005; 187(12):4064-76.4
82. Smith DJ, Mattos-Graner RO. Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 319:131-56.
83. Smith EG, Spatafora GA. Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. *J Dent Res.* 2012; 91(2):133-41.
84. Stephenson K, Hoch JA. Virulence- and antibiotic resistance-associated two-component signal transduction systems of Gram-positive pathogenic bacteria as targets for antimicrobial therapy. *Pharmacol Ther.* 2002; 93(2-3):293-305.
85. Stipp RN. Caracterização dos regulons de CovR e VicRK em *Streptococcus mutans*. [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2010.

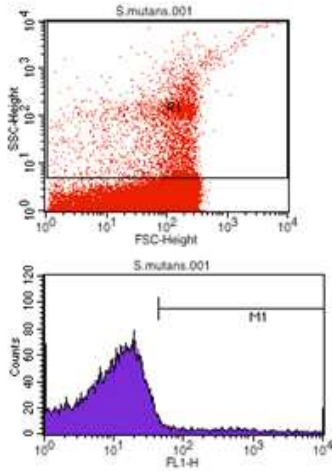
86. Stipp RN, Gonçalves RB, Höfling JF, Smith DJ, Mattos-Graner RO. Transcriptional analysis of *gtfB*, *gtfC*, and *gbpB* and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(6):466-73.
87. Stipp RN, Boisvert H, Smith DJ, Höfling JF, Duncan MJ, Mattos-Graner RO. CovR and VicRK regulate cell surface biogenesis genes required for biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *PLoS One*. 2013; 8(3):e58271.
88. Stinson M, Ezra D, Hess WM, Sears J, Strobel GA. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eucryphia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds. *Plant Sci*. 2003; 165, 913–922.
89. Sumbly P, Whitney AR, Graviss EA, DeLeo FR, Musser JM. Genome-wide analysis of group a streptococci reveals a mutation that modulates global phenotype and disease specificity. *PLoS Pathog*. 2006; 2(1):e5.
90. Qi F, Merritt J, Lux R, Shi W. Inactivation of the *ciaH* Gene in *Streptococcus mutans* diminishes mutacin production and competence development, alters sucrose-dependent biofilm formation, and reduces stress tolerance. *Infect Immun*. 2004; 72(8):4895-9.
91. Vizoto NL. Influência do regulador CovR na resposta de *Streptococcus mutans* ao contato com a saliva e sangue. [dissertação]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba; 2011.
92. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 32(2):259-86.
93. Vollmer LL, Jiménez M, Camarco DP, Zhu W, Daghestani HN, Balachandran R, et al. A simplified synthesis of novel dictyostatin analogues with in vitro activity against epothilone B-resistant cells and antiangiogenic activity in zebrafish embryos. *Mol Cancer Ther*. 2011; 10(6):994-1006.

94. Yuste J, Ali S, Sriskandan S, Hyams C, Botto M, Brown JS. Roles of the alternative complement pathway and C1q during innate immunity to *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol*. 2006; 176(10):6112-20.
95. Yuste J, Sen A, Truedsson L, Jönsson G, Tay LS, Hyams C, et al. Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infect Immun*. 2008; 76(8):3761-70.
96. Weiser JN. The battle with the host over microbial size. *Curr Opin Microbiol*. 2013; 16(1):59-62.
97. Winstel V, Xia G, Peschel A. Pathways and roles of wall teichoic acid glycosylation in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2013; 4221(13)00159-8.

ANEXO 1

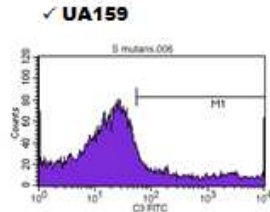
Gráficos de Análise de Citometria de Fluxo:

1- Ligação de C3b à superfície bacteriana



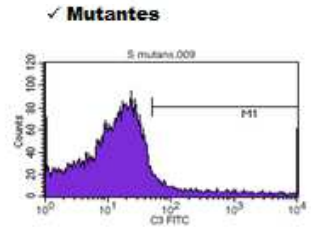
File: S.mutans.001 Tube: UA159 s/m
 Acquisition Date: 24-Oct-13 Gate: G1
 Gated Events: 20800 Total Events: 188290

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1,9910		20800	100.00	11.05
M1	57,9910		859	4.13	0.46



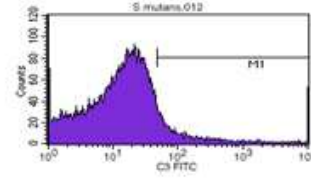
File: S.mutans.006 Tube: UA159 pool 2
 Acquisition Date: 24-Oct-13 Gate: G1
 Gated Events: 20580 Total Events: 174520

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1,9910		20580	100.00	11.79
M1	54,9910		4723	22.95	2.71



File: S.mutans.009 Tube: UAICOV- pool
 Acquisition Date: 24-Oct-13 Gate: G1
 Gated Events: 19724 Total Events: 216327

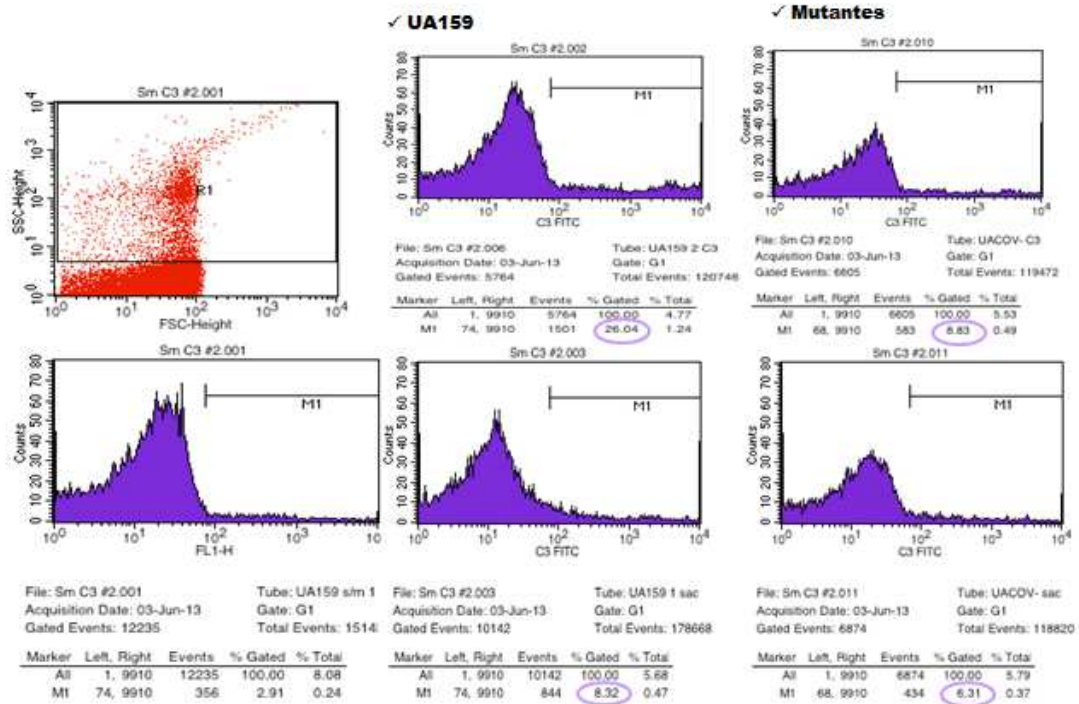
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1,9910		19724	100.00	9.12
M1	50,9910		1892	9.59	0.87



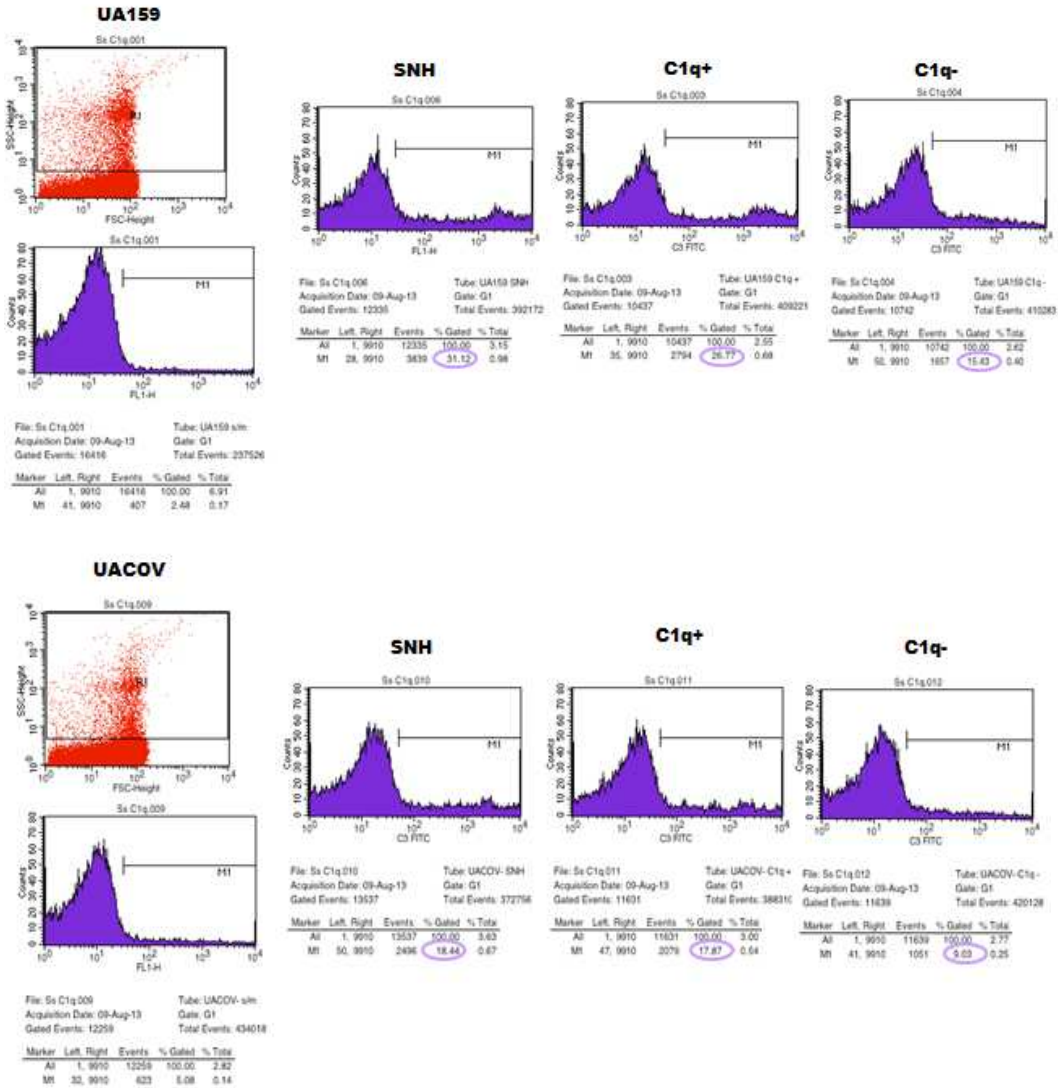
File: S.mutans.012 Tube: UAIVC- pool
 Acquisition Date: 24-Oct-13 Gate: G1
 Gated Events: 21132 Total Events: 161013

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1,9910		21132	100.00	13.12
M1	47,9910		1876	8.88	1.17

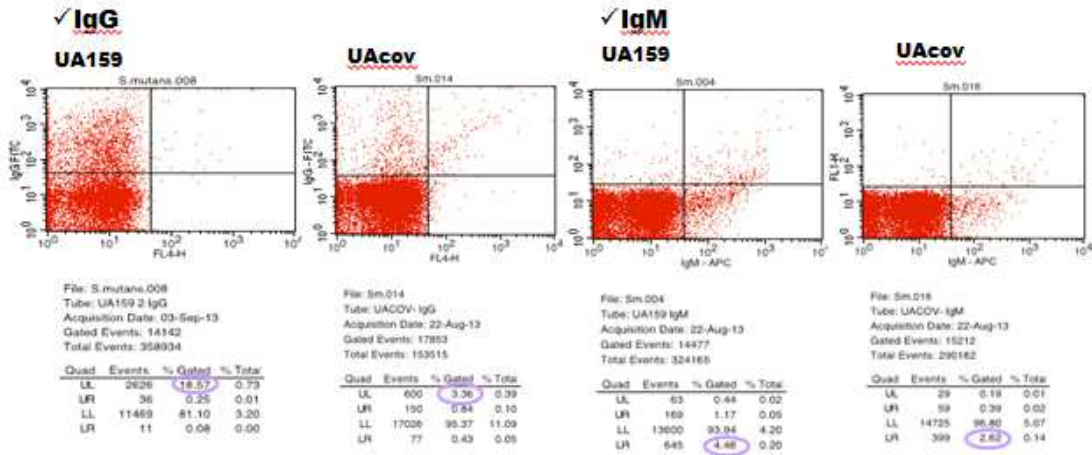
2- Ligação de C3b à superfície bacteriana na presença de sacarose



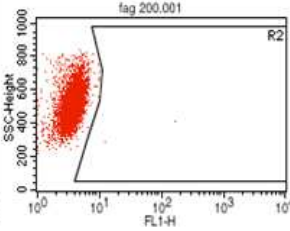
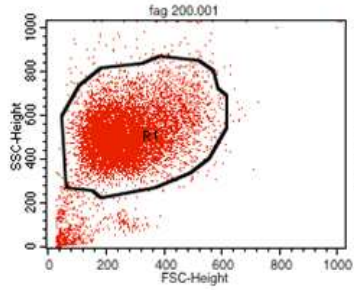
3- Ligação de C3b à superfície bacteriana na presença ou ausência de C1q



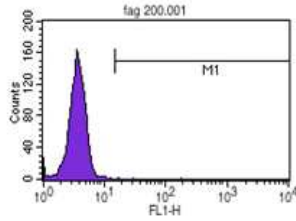
4- Quantificação de anticorpos opsonizantes sobre à superfície de *S. mutans*



5- Fagocitose bacteriana por PMNs



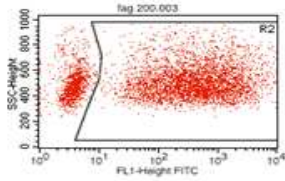
Region	Events	% Gated	% Total
R2	9	0.09	0.08
R1	9955	100.00	92.40



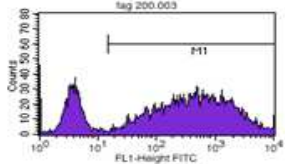
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1,9910		9955	100.00	92.40
M1	15,9910		4	0.04	0.04

Presença de Soro

UA159



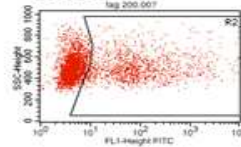
Region	Events	% Gated	% Total
R2	7876	78.55	67.18
R1	10027	100.00	85.53



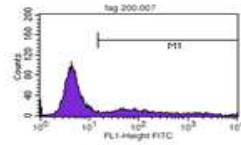
Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1,9910		10027	100.00	85.53
M1	15,9910		7834	76.13	66.83

✓ Mutantes

UAcov

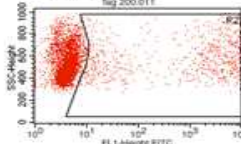


Region	Events	% Gated	% Total
R2	2925	29.43	25.49
R1	9939	100.00	86.61

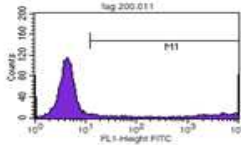


Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1,9910		9939	100.00	86.61
M1	15,9910		2571	25.87	22.40

UAvic

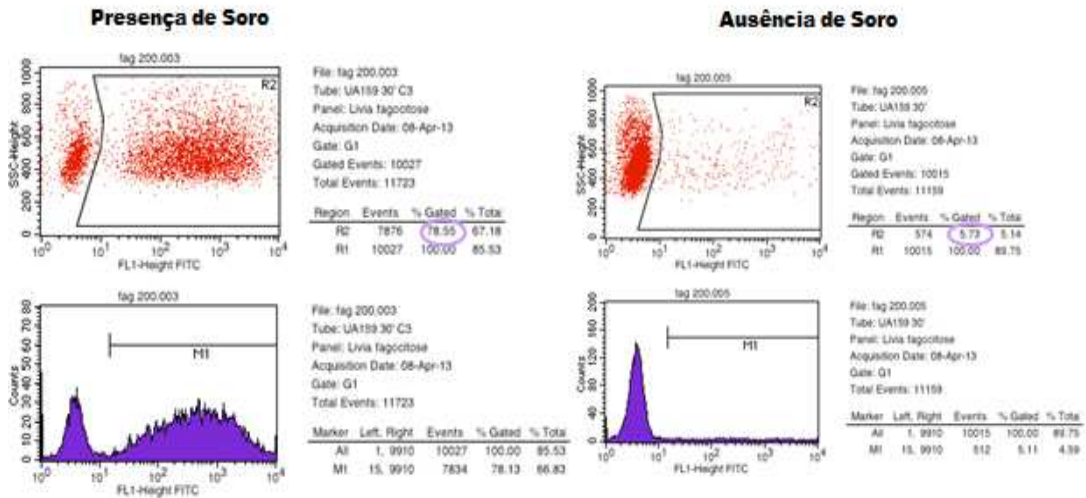


Region	Events	% Gated	% Total
R2	1523	15.50	10.92
R1	9824	100.00	70.44



Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total
All	1,9910		9824	100.00	70.44
M1	12,9910		1423	14.48	10.20

6- Comparação de fagocitose na presença ou ausência de soro



ANEXO 2

Tabela 1: Genes regulados pelos mutantes UAvic e UAcov em SM UA159.

Gene ID (NCBI)	Encoded protein; conserved domains	UAvic		UAcov	
		Microarray fold	qPCR fold	Microarray fold	qPCR fold
Biogenesis of and/or interaction with extracellular matrix					
SMU.22*	GbpB; peptidoglycan hydrolase activity domain	-3.4	-2.2 [†]	NS	+1.4 [‡]
SMU.772	GbpD; Glucan-binding and esterase/lipase domains	-2.2	-1.9 [‡]		
SMU.910	GtfD; Glucan-binding and dextransucrase-like domain	-6.1	-14.1 [†]		
SMU.1004*	GtfB; Glucan-binding and dextransucrase-like domain	-1.8	-2.9 [†]	+22.0	+18.0 [†]
SMU.1005*	GtfC; Glucan-binding and dextransucrase-like domain	NS	-1.4 [‡]	+2.5	+4.5 [†]
SMU.1396	GbpC; Glucan binding and LPXTG domains			+12.4	+4.6 [†]
SMU.1432c	endoglucanase; Glycosyl hydrolase family 8 domain			+5.2	
SMU.2028*	Ftf; Levansucrase activity domain	-4.5	-3.9 [†]	+2.5	+1.5 [†]
Cell wall or cell envelope biogenesis					
↳ Cell wall biogenesis					
SMU.367	SceB; Lysin and CHAP amidase domains	-2.2	-1.5 [‡]		
SMU.575c	YsbA; LrgA murein hydrolase exporter domain			+7.2	+4.5 [†]
SMU.609	SmaA; SH3b murein hydrolase and BSP-like domains *	+16.1	+13.7 [†]		
SMU.1006	SMU.1006; SaIX ABC-type domain [‡]			+5.9	+3.0 [†]
SMU.1091*	WapE; YSIRK signal (cross-wall-targeting lipoprotein signal motif) domain	-2.8	-1.7 [‡]	+2.6	+1.8 [†]
SMU.1434c	WcaA; CESA-like (cellulose synthase superfamily) domain			+4.3	+2.9 [†]
SMU.1437c	EpsC; wecB (UDP-N-Acetylglucosamine 2-Epimerase) domain			+3.5	+2.6 [†]
SMU.1918c	DedA; SNARE-like domain [‡]			+4.9	+3.0 [†]
SMU.2146c	SMU.2146c; Transglycosylase SLT domain [‡]	-15.2	-15.2 [†]		
SMU.2147c*	LysM; Lysin and NlpD domains	-3.4	-3.5 [†]	+2.6	+1.8 [†]

* Indicates genes/operon-like gene clusters regulated by both CovR and VicR.
[‡] BSP-like repeat found in BSP proteins which might control cell morphology in group B *Streptococcus*.
[§] Present in protein for cell division (FtsE) and macrolide efflux carrier (MacAB).
[¶] Putative function in envelope biogenesis (lipid synthesis or cell division).
[‡] Degrade murein via cleavage of the beta-1,4-glycosidic bond between N-acetylmuramic acid and N-acetylglucosamine.
[§] Present in conjugative transfer proteins.
[¶] Found in phosphosugar isomerases and phosphosugar binding proteins.
[§] Found in multi-domain enzymes which synthesize peptide antibiotics.
[¶] Present in bacteriocin-processing endopeptidases.
[†] p<0.01, ANOVA with post hoc Dunnett's test.
[‡] p<0.05, ANOVA with post hoc Dunnett's test.
 NS: Not significant

Fonte: Tabela adaptada de *Stipp et al., 2013 (PlosOne)*, mostrando algum dos genes regulados por UAvic e UAcov envolvidos com a formação da matriz extracelular e biogênese de parede celular.