



UNICAMP

Thaís Rossini de Oliveira

**Estudo da participação dos reguladores de transcrição
gênica VicRK e CovR na susceptibilidade de
Streptococcus sanguinis à opsonização pelo
sistema complemento**

Piracicaba – SP

2014



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Thaís Rossini de Oliveira

**Estudo da participação dos reguladores de transcrição
gênica VicRK e CovR na susceptibilidade de
Streptococcus sanguinis à opsonização pelo
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.

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

Coorientadora: Profa. Dr^a. Flávia Sammartino Mariano Rodrigues

Orientadora

Piracicaba - SP

2014

iii

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

OL4e Oliveira, Thaís Rossini de, 1989-
Estudo da participação dos reguladores de transcrição gênica VicRK e CovR na susceptibilidade de *Streptococcus sanguinis* à opsonização pelo sistema complemento / Thaís Rossini de Oliveira. – 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. Fagocitose. 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 role of the transcriptional regulators VicRK and CovR in the susceptibility of *Streptococcus sanguinis* to opsonization by the complement system

Palavras-chave em inglês:

Complement activation

Phagocytosis

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Mestra em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

Renata de Oliveira Mattos Graner [Orientador]

Ruchele Dias Nogueira

Marcelo Rocha Marques

Data de defesa: 12-12-2014

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 12 de Dezembro de 2014, considerou a candidata THAÍS ROSSINI DE OLIVEIRA aprovada.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Renata", written over a horizontal line.

Profa. Dra. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Richele", written over a horizontal line.

Profa. Dra. RICHELE DIAS NOGUEIRA

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Marcelo", written over a horizontal line.

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES

RESUMO

Streptococcus sanguinis é uma espécie pioneira comensal das superfícies dos dentes, que também está envolvida na endocardite infecciosa. Sua alta prevalência na cavidade oral indica capacidade de adaptar-se e sobreviver a diversos fatores de defesa presentes nesse nicho. Para se adaptar ao ambiente e a fatores do hospedeiro, as bactérias utilizam-se de sistemas reguladores de transcrição de dois componentes (SDC), que modulam a regulação de genes em respostas a diferentes estímulos. Neste estudo avaliou-se o papel do SDC VicRK e CovR, na susceptibilidade de *S. sanguinis* a opsonização pelo sistema complemento. Para isso, foram analisados os níveis de deposição de C3b / iC3b na presença de soro em um total de sete cepas clínicas de *S. sanguinis*, e as frequências de fagocitose por polimorfonucleares (PMNs) do sangue humano foram comparados entre as cepas *S. sanguinis* SK36 e mutantes *knockout* de *vicK* (SKvic) e *covR* (SKcov), genes estes que codificam componentes VicK e CovR, respectivamente. A cepa de *S. mutans* U159 foi utilizada como referência. Resumidamente, as cepas foram incubadas com soro humano a 2 ou 20% por 30 min (37 ° C, 10% de CO₂), lavadas, e a presença de C3b associada à superfície foi detectado utilizando anticorpos anti-C3b humano (conjugado com FITC), sendo quantificadas por citometria de fluxo. Para avaliar as frequências de fagocitose por PMNs, as cepas foram incubadas com sangue humano durante tempos de 5, 15, 30 e 60 min (37 ° C, 10% de CO₂), fixadas e coradas com May-Grunwald-Giemsa. PMNs com bactérias intracelulares, foram contados utilizando um microscópio de luz (1000 x) e os resultados expressos em relação a análise de um total de 200 PMNs. Resultados: As percentagens de deposição de C3b em SKvic, SKcov e SK36 foram de 5,65 (± 5,4), 9,4 (± 3,09) e 7,22 (± 6,1) em soro a 2% e 11,3 (± 2,61), 40,2 (± 1,46) e 37,9% (± 3,97) em soro a 20%, respectivamente. Percentagem de superfície C3b foi significativamente menor em cepas de *S. sanguinis* em comparação a cepa de *S. mutans* (Kruskal Wallis, $p < 0,05$), e em SKvic em comparação a cepa SK36 (Kruskal Wallis, $p < 0,05$). As frequências médias de fagocitose por PMNs não foram afetadas, e foram 88, 99,3 e 99% em SKvic, SKcov e SK36, respectivamente. Conclusão: a inativação do VicK, mas não de CovR, reduz a deposição de C3b em *S. sanguinis* SK36. Cepas de *S. sanguinis* também são menos suscetíveis a deposição de C3b em comparação a *S. mutans*.

Palavras-chave: *Streptococcus sanguinis*, Fagocitose, Ativação do Complemento.

ABSTRACT

Streptococcus sanguinis is a commensal pioneer species of the tooth surfaces, which is also involved in infectious endocarditis. Its high prevalence in the oral cavity indicates ability to survive to several host defense factors present in the oral niches. To sense and respond to environmental and host factors, bacteria apply regulatory two-component systems (TCSs), which modulate gene transcription in response to different stimuli. This study evaluated the role of TCS VicRK and CovR in *S. sanguinis* susceptibility to opsonization by the complement system. To this aim, a total of seven *S. sanguinis* clinical strains were analyzed, and levels of deposition of C3b/iC3b on the present of serum, and the frequencies of phagocytosis by polymorphonuclear (PMNs) in human blood were compared between parent *S. sanguinis* strain SK36 and knockout mutants of *vick* (SKvic) and *covR* (SKcov) genes encoding VicK and CovR components, respectively. *S. mutans* strain U159 was used as reference. Briefly, strains were incubated with 2 or 20% of human serum during 30 min (37°C, 10%CO₂), washed, and the presence of surface-associated C3b was detected using anti-human C3b antibodies (FITC conjugated), which were quantified by flow cytometry. To assess the frequencies of phagocytosis by PMN, strains were incubated with human blood during 5, 15, 30 and 60 min (37°C, 10% CO₂), fixed and stained with May-Grunwald-Giemsa. PMN with intracellular bacteria were counted using a light microscope (1000 x) and expressed in relation to a total of 200 PMN analyzed. Results: The percentages of C3b deposition on SKvic, SKcov and SK36 were 5,65 (± 5,4), 9,4 (± 3,09) e 7,22 (± 6,1) for 2% serum and 11.3 (± 2.61), 40.2 (± 1.46) and 37.9% (± 3.97) for 20% serum, respectively. Percentage of surface C3b was significantly lower in *S. sanguinis* strains compared to *S. mutans* (Kruskal Wallis, $p < 0.05$), and in SKvic compared to SK36 (Kruskal Wallis, $p < 0.05$). The mean frequencies of phagocytosis by PMN was not affected, and were 88, 99.3 and 99% in SKvic, SKcov and SK36, respectively. Conclusion: the inactivation of the *vick*, but not of *covR*, reduces the deposition of C3b in *S. sanguinis* SK36. *S. sanguinis* strains are also less susceptible to C3b deposition compared to *S. mutans*.

Keywords: Streptococcus sanguinis , Phagocytosis , Complement Activation.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xix
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
3 PROPOSIÇÃO	9
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
5 RESULTADOS	15
6 DISCUSSÃO	23
7 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	30

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, **Edson de Oliveira** e **Solange Aparecida Rossini de Oliveira**, pelo exemplo e valores imprescindíveis para a construção de uma existência com honestidade e sinceridade. Ao meu irmão, **Danilo Rossini de Oliveira**, que é meu grande cúmplice e amigo de todos os momentos. É um grande orgulho tê-lo em minha vida.

A minha avó **Amabile Maria Arnosti Rossini** e A meu tio **Marcelo Rossini**, tia **Denise Rossini Penteado** e tio **Ângelo Roberto Penteado**, agradeço por todo apoio e compreensão para essa conquista.

Ao meu avô **Ermelindo Rossini** (*in memoriam*) pelo carinho, pelos ensinamentos e por me acompanhar sempre, ao longo do meu crescimento pessoal e vida acadêmica.

Com carinho, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda a sabedoria, pela a oportunidade da vida, a felicidade de nascer em uma família tão maravilhosa e a possibilidade de enfrentar os desafios pessoais e profissionais ao longo dessa jornada.

À **Universidade Estadual de Campinas** na pessoa do Reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge, e a Faculdade de Odontologia de Piracicaba, através do diretor Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques, a oportunidade concedida em estudar nesse centro que é referência para a Odontologia.

À minha orientadora **Profª Drª Renata de Oliveira Mattos-Graner**, por aceitar o desafio de orientar-me e guiar meus primeiros passos na pesquisa e desenvolvimentos pessoais e profissionais. Agradeço o auxílio e paciência, ainda que em dúvidas tão básicas e constantes na elaboração deste trabalho. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos que obtive nesse período do mestrado.

À minha co-orientadora, **Profª Drª Flávia Sammartino Mariano Rodrigues**, pela paciência e dedicação durante todas as fases deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Francisco Höfling**, agradeço todas as oportunidades que me foram confiadas. Agradeço todo aprendizado durante meu estágio supervisionado, que aguçou ainda mais meu interesse pela área de Microbiologia e Imunologia. Agradeço principalmente seu imenso carinho e devoção pelo crescimento e desenvolvimento dos laboratórios de pesquisa da área.

Ao **Prof. Dr. Rafael Nobrega Stipp**, agradeço por toda paciência e ensinamentos compartilhados ao longo desses anos de minha formação profissional.

Aos examinadores que aceitaram compor a banca de dissertação (em ordem alfabética), titulares: **Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques** e **Profª. Drª. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins**; suplentes **Profª Drª Julianna Joanna Carvalho Moraes de Campos Baldin** e **Prof Dr Pedro Duarte Novaes**.

Aos companheiros da Laboratório de Microbiologia e Imunologia (em ordem alfabética) Erika Nikitza Harth Chú, Fabiana Paganotti Roque, Felipe Joia, Giovana Claudia Boni, Italo Sarto Carvalho Rodrigues, Jeferson Junior da Silva, Manoel Francisco Rodrigues Netto, Mariana Ferreira Dib João, Marcelle MarieBuso Ramos, Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, Paula Cristina Anibal, Simone Nataly Busato, Thaís Harder de Palma e Thaís Rodrigues de Carli.

Em especial agradeço a **Erika Nikitza Harth Chú, Julianna Joanna Carvalho Moraes de Campos Baldin, Marcelle Marie Buso e Simone Nataly Busato**, excelentes profissionais e acima de tudo grandes, devo muito a vocês, por todos os ensinamentos, carinho e amizade solidificados nesses anos de convivência

Aos colegas e funcionários que passaram pela Microbiologia e compartilharam momentos de descobertas e crescimento profissional **Ivete Medeiros, Micaela Cardoso, Monalisa, Igor Alves, Renata Preté, Tiago Taiete, Thiago Rosa, Viviene Santana Barbosa, Wilma Corrêa**.

Aos funcionários desta Faculdade, técnicos **Valeria Alessandra Defavari Franco**, técnica do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Oral, **Fabio Haach Téó**, técnico do aparelho Citômetro de Fluxo.

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

Ao **CNPq** pela bolsa de mestrado fornecida.

À **Profª Drª Maria Izabel Camargo-Mathias e Profª Drª Karim C. S. Furquim** do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - Rio Claro, pela disponibilidade, atenção e presteza no auxílio para obtenção de foto microscopia óptica.

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

"Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças."

(Charles Darwin)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C: grau Celsius.

µl: unidade de volume em microlitros

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

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

A_{600nm}: absorbância no comprimento de onda de 600 nanômetros

AtlA: autolisina A.

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

BHIs: BHI comercial acrescido de sacarose a 0,1%.

BHE: BHI comercial acrescido de antibiotico eritromicina

BHEs: BHI comercial acrescido de antibiótico eritromicina e sacarose a 0,1%.

BHEspt: BHI comercial acrescido de antibioticos eritromicina e spectinomicina

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.

EI: Endocardite Infecciosa.

erm: antibiótico eritromicina.

et al.: e outros (de et alli)

Fc: fração cristalizável do anticorpo.

FCS: de Foward Scatter

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

xg: unidade de força centrífuga relativa (RCF).

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

Gbps: proteínas ligadoras de glucano.

h: horas

HK: histidina-quinase.

iC3b: fragmento inativo de C3b.

IgG: Imunoglobulina G.

IgM: Imunoglobulina M.

ml: unidade de volume em mililitros.

min: minutos

DO: Densidade óptica

PA: película adquirida.

PMNs: 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*).

pH: potencial de hidrogênio.

rpm: rotações por minuto

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

RPMI_{term}: RPMI_{comercial} acrescido de antibiotico eritromicina

RR: regulador de resposta.

SM: *Streptococcus mutans*.

SK36: cepa de referência de *Streptococcus sanguinis*

SK_{cov}: mutante por ausência do gene covR

SK_{vic}: mutante por ausência do gene vick

SK_{vic}⁺: mutante complementado do gene vick

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

SSC: de Side Scatter

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UA159: cepa de referência de *Streptococcus mutans*.

UA_{cov}: mutante por ausência do gene covR. UA_{cov}⁺: mutante complementado do gene covR.

UAvic: mutante 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*).

WT: Selvagem (do inglês *wide tipe*).

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Streptococcus sanguinis* pertence a um dos cinco grupos taxonômicos de estreptococos viridans (Ge *et al.*, 2008) reconhecida como comensal benéfica dos dentes, seu principal nicho ecológico. Embora relativamente inofensivos, os membros da microbiota oral podem invadir a corrente sanguínea através do sulco gengival e mucosa oral, o que é favorecido por procedimentos odontológicos ou de higiene bucal. O acesso à corrente sanguínea pode ocasionalmente causar complicações sistêmicas, tais como endocardite bacteriana subaguda (Chiu B, 1999; Koren *et al.*, 2011). Estes microrganismos também são detectados em placas ateroscleróticas (Chiu B, 1999; Koren *et al.*, 2011). O acesso a novos nichos do hospedeiro impõe a detecção e rápida resposta fisiológica a diferentes estresses, como por exemplo, mudanças de temperatura, pH, pressão osmótica, exposição a agentes oxidantes e fatores imunológicos do hospedeiro, o que envolve a ativação de sistemas de dois componentes (SDC) (Raghavan & Groisman, 2010; Duque *et al.*, 2011).

Proteínas de superfície ligadas à parede celular de patógenos gram-positivos de humanos como estreptococos, são os principais determinantes de virulência, participando em vários processos biológicos, como interações com a matriz extracelular dos tecidos do hospedeiro, interações com células humanas e evasão do sistema imunológico. Em diversas espécies de estreptococos, os SDC VicRK e CovR têm sido implicados em inúmeros processos de colonização e patogenicidade de diversos nichos da mucosa e resposta a fatores do sangue (Hyams *et al.*, 2011). Entretanto, não se sabe sobre o papel destes sistemas no escape bacteriano ao sistema complemento, o qual é componente essencial da imunidade inata para o reconhecimento e fagocitose de bactérias Gram-positivas pelo hospedeiro (Negrini *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2013).). Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar em *S. sanguinis*, o efeito de dois SDC reguladores de genes de virulência e biogênese de parede celular no escape à opsonização pelo sistema complemento e fagocitose por PMNs humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Streptococcus* spp. como membros da microbiota bucal

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 (também conhecidos como placa dental), os quais consistem bilhões de microrganismos organizados em uma matriz extracelular composta principalmente de produtos microbianos, incluindo polissacarídeos e DNA extracelular (Marsh, 2003). Estima-se que 20% das bactérias orais cultiváveis são *Streptococcus* (Schachtele *et al.*, 2007), enquanto esta proporção pode ser de 3 a 4 vezes maior em biofilmes dentários formados durante as primeiras 24 h de colonização dos dentes (Nyvad & Kilian, 1987). Os estágios iniciais da formação de biofilme dental envolvem interações específicas entre adesinas bacterianas com um filme de origem principalmente salivar adsorvido às superfícies dentárias, o qual é denominado película adquirida (PA). A PA é formada por diversas moléculas salivares (anticorpos IgAS, proteínas ricas em prolina, estaterina, α -amilase, estaterina e mucinas) e também por produtos e componentes microbianos, como por exemplo polissacarídeos (Kolenbrander & London, 1993). A grande maioria dos colonizadores iniciais da PA são do gênero *Streptococcus*, em parte porque diversas espécies deste gênero apresentam adesinas de alta afinidade a componentes da PA. Estima-se que os estreptococos correspondem entre 60 a 80% do biofilme dental formado durante as primeiras 8 h após a limpeza dos dentes (Diaz *et al.*, 2006). Os estreptococos continuam predominando nos biofilmes dentários durante as 24h de maturação (Aas *et al.*, 2005; Nyvad & Kilian, 1987). Estes organismos pioneiros fornecem novos receptores de superfície e mudam as condições ecológicas locais através de suas atividades metabólicas, permitindo a colonização por novas espécies microbianas (Diaz *et al.*, 2006; Marsh, 2003).

2.2 Participação de *Streptococcus sanguinis* em doenças sistêmicas

Há evidências de que espécies bucais do gênero *Streptococcus*, podem estar envolvidas em doenças sistêmicas em pessoas saudáveis ou indivíduos imunocomprometidos (Hohwy *et al.*, 2001). A alta prevalência e proporção na microbiota bucal de *S. sanguinis* indica a capacidade desta espécie em se adaptar e sobreviver a diversos fatores de defesa do hospedeiro (Kreth *et al.*, 2005; Kreth *et al.*, 2009). *S. sanguinis* (previamente designado *Streptococcus sanguis*) é a espécie mais comumente associada às endocardites infecciosas, e um patógeno emergente de diversos problemas sistêmicos desencadeados pelo acesso à corrente sanguínea (Mylonakis *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2007). A alta frequência e/ou proporção desta espécie nos biofilmes dos dentes (locais de íntima associação com vasos sanguíneos do tecido gengival) talvez contribua para o comum acesso desta espécie à corrente sanguínea. Entretanto, é possível que existam fatores de escape aos componentes de defesa presentes na corrente sanguínea.

Entre as diversas espécies de estreptococos que colonizam humanos com genoma conhecido, *S. sanguis* é a espécie com maior número de adesinas e proteínas de parede celular do que diversas outras espécies de estreptococos que colonizam humanos (Xu *et al.*, 2007). Sabe-se por exemplo, que *S. sanguinis* são capazes ainda de induzir agregação plaquetária em plasma humano, o que é um possível fator de virulência desta espécie na patogenia de doenças como endocardites infecciosas (EI) e aterosclerose (Herzberg *et al.*, 2005). Entre tanto, até onde sabemos, não há estudos investigando a susceptibilidade desta espécie à opsonização pelo sistema complemento.

2.3 Fatores de virulência de *S. sanguinis*

Fatores que contribuem para a patogenicidade em EI, possivelmente atuam nas diferentes fases de infecção. Assim, após acesso à corrente sanguínea, os patógenos devem escapar de fatores de defesa do sangue para se aderir à superfície do endocárdio com superfície lesadas ou inflamadas, as quais

apresentam agregado de plaquetas e fibrina sobre o endotélio. Bactérias se estabelecem nestes locais promovendo a maturação destas vegetações através da proliferação, produção de componentes extracelulares e agregação com fatores do hospedeiro, o que permite o acúmulo microbiano e escape a fatores de defesa. Este processo culmina com a liberação de fragmentos das vegetações formando microtrombos envolvidos em derrames, hemorragia cerebral, meningite e outras complicações (Werdan *et al.*, 2014). Entre os fatores de virulência de *S. sanguinis* na EI, foram bem estudados sua capacidade de induzir a agregação plaquetária (Herzberg *et al.*, 1983) e fatores de interação com componentes de matriz extracelular, mas poucos genes foram ainda identificados como participantes da virulência nesta espécie (Ge *et al.*, 2008; Crump *et al.*, 2014).

Cerca de 60% das cepas do grupo Mitis (o qual inclui a espécie *S. sanguinis*) são capazes de induzir a agregação plaquetária *in vitro* (Herzberg *et al.*, 1983, 1990). Em *S. sanguinis*, este processo envolve adesinas de ligação à plaqueta e uma proteína de agregação associada a plaqueta designada PAAP, a qual ativa a agregação (Herzberg *et al.*, 1983). Plaquetas ativadas também liberam fatores de coagulação e ativam trombina local, iniciando a conversão de fibrinogênio em fibrina. O agregado de plaquetas humanas resultante tem a característica de um emaranhado de fibrina ou trombo séptico.

Descritos por Ge *et al.* (2008), os genes *purB*, *purL*, *thrB* e *pyrE* estão associados a redução da formação de biofilme *in vitro* e com o papel atenuante para um modelo de endocardite em coelho, *in vivo*. Os genes citados foram selecionados após ensaios realizados com uma biblioteca de 800 mutantes para a cepa de *S. sanguinis*, SK36. Os resultados mostram que somente esses quatro genes se mostram eficazes para formação de biofilme e para desenvolvimento de endocardite simultaneamente. Isso indica que a capacidade de formar biofilme *in vitro* de *S. sanguinis* é independente de fatores de virulência de endocardite *in vivo*. Estudos que induzem a formação de vegetação *in vivo*, concluem que mutações nos genes reguladores de proteínas captadoras de íons e proteínas transportadoras, possuem uma redução na virulência (Crump *et al.* 2014). Entre os mutantes estudados, *sodA* (codificador de superóxidos dismutase), *ssaB*

(codificador de lipoproteína de sistema ABC de transporte de manganês) foram mais virulentos em modelo de endocardite (Crump *et al.* 2014). Esses resultados sugerem que transportadores de manganês pelo sistema SsaABC desempenham papel importante na virulência, além de servir como co-fatores ou indutores de sodA.

2.3.1 Escape à opsonização

O sistema complemento compreende alguns dos principais componentes solúveis do sistema imune inato presentes no sangue humano, envolvido na opsonização de microrganismos (Abbas & Lichtman, 2007). As proteínas solúveis do complemento, 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, através de receptores de C3b (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 que a via alternativa seja desencadeada. A via da lectina apresenta lectinas ligadoras de manose, encontradas no soro, que se ligam a grupos de manose comuns na superfície de bactérias (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). No genoma de *S. sanguinis* SK36, identificamos 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).

Em *S. mutans*, 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 *S. mutans* também tem domínios característicos de autolisinas e está implicada na divisão celular e morfogênese (Mattos-Graner *et al.*, 2001; Duque *et al.*, 2011). O ortólogo de *gbpB* foi identificado em *S. sanguinis* (denominado *pcsB*) e também nesta espécie, verificamos que *pcsB* é regulado por VicRK (Moraes *et al.*, 2014). Uma das nossas hipóteses é que autolisinas reguladas por VicRK possam interferir na susceptibilidade bacteriana à marcação pelo sistema

complemento e outros fatores de defesa presentes em fluídos humanos como sangue e saliva em espécies orais de estreptococos, incluindo-se *S. sanguinis*.

2.4 Sistemas de Dois Componentes e o papel das proteínas reguladoras VicRK e CovR na virulência de bactérias do gênero *Streptococcus*

Os sistemas de dois componentes (SDCs) são fundamentais para a detecção, resposta e adaptação bacteriana a estímulos ambientais (Lamy *et al.*, 2004; Dalton *et al.*, 2006). 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. Um total de 14 SDC foram identificados no genoma da cepa *S. sanguinis* SK36, além do RR órfão (sem o receptor HK cognato) CovR (SS.1810) (Xu *et al.*, 2007). O sistema VicRK foi analisado por nosso grupo e está envolvido no processo de divisão celular e na capacidade de formação de biofilmes de forma dependente da produção de DNA extracelular, além de regular hidrolases de mureína ainda com função desconhecida (Moraes *et al.*, 2014). Os sistema VicRK é altamente conservado entre espécies de bactérias Gram-positivas (Dubrac *et al.*, 2004) e regula a biogênese da parede celular e proteínas de virulência associadas à superfície celular em diversas espécies, entre elas estreptococcus do trato oro-respiratório como *S. mutans* e *S. pneumoniae* (Senadheera *et al.*, 2005; Duque *et al.*, 2011; Stipp *et al.*, 2010). Entretanto, análises comparativas entre mutantes deste sistema obtidos nas espécies *S. mutans* e *S. sanguinis*, revelam que este sistema desempenha funções espécie-específicas (Moraes *et al.*, 2014). Diferente de *S. mutans*, a formação de biofilmes regulada pelo sistema VicRK em *S. sanguinis* é dependente a liberação de DNA de forma independente de lise bacteriana, sugerindo mecanismos ativos de

secreção de DNA genômico (Moraes *et al.*, 2014). Em *S. mutans*, verificamos que a inativação de *vick* reduz drasticamente a fagocitose por PMN em sangue humano (Negrini *et al.*, 2011) e a deposição de C3b do complemento (Alves, 2013).

O regulador órfão CovR, também conhecido como GcrR (de Glucan binding protein Cregulator), reprime diversos genes de virulência que são regulados positivamente por VicRK em *S. mutans* (Senadheera *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2006; Stipp *et al.*, 2011). A interação entre estes dois sistemas regulatórios ainda não é totalmente conhecida, mas parece existir em *S. mutans* e em outras espécies, como *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*). Diversos genes de biogênese de parede celular de *S. mutans* regulados pelo sistema VicRK, não estão presentes no genoma de *S. sanguinis*, incluindo-se os genes *lysM*, *smaA*, *SMU_2146c* (Stipp *et al.*, 2013).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a participação dos reguladores de transcrição VicRK e CovR na susceptibilidade de *Streptococcus sanguinis* à opsonização pelo sistema complemento

Para isto, os objetivos específicos deste trabalho incluíram:

- 1) Características de crescimento planctônico em diferentes meios de cultura para cepa selvagem e mutantes *knockouts* de *Streptococcus sanguinis*
- 2) Analisar entre isolados clínicos de *Streptococcus sanguinis* a diversidade na susceptibilidade à deposição de C3b do complemento.
- 3) Comparar a ligação de proteínas do complemento C3b/iC3b sobre a superfície bacteriana, entre as cepas SK36, mutantes SKvic, SKcov, respectivas cepas complementadas em isolados clínicos de saliva e sangue.
- 4) Comparar a frequência de fagocitose por PMN humanos em sangue humano entre a cepa SK36, mutantes *vick* e *covR* e respectivas cepas complementadas .

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas e condições de cultivo

As cepas *S. sanguinis* utilizadas neste estudo incluem, cepa selvagem SK36, isolados clínicos da cavidade oral SK72, SK49, SK115 e isolados clínicos de sangue SK330, SK353 e SK1056, estes cedidos pelo Dr Mogens Kilian, Universidade de Aarhus, Dinamarca. Mutantes *knockout* dos genes *vick* e *covR* obtidos a partir de SK36, designados respectivamente, SKvic e SKcov, foram obtidos em estudo anterior (Moraes *et al.*, 2014; Harth-Chú, dados não publicados). Como referência para os ensaios realizados neste estudo, foram usadas cepas de *Streptococcus mutans* UA159 e respectivos mutantes *knockouts* *vick* (UAvic) e *covR* (UAcov) caracterizadas em estudos anteriores (Duque *et al.*, 2011; Stipp *et al.*, 2013).

Para cada ensaio, as cepas selvagens SK36, UA159 e cepas clínicas foram cultivadas em meio *Agar Brain Heart Infusion* (BHA), cepas mutantes e cepas complementadas foram cultivadas em BHA acrescido de antibiótico eritromicina na concentração de 10µg/ml (BHE) (Merck Labs, Alemanha) respectivamente e assim, 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 das cepas selvagens foram inoculadas em 5ml de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), seus respectivos mutantes inoculados em 5ml de caldo BHI com eritromicina (BHE) e incubadas sob as mesmas condições durante 18 h.

4.2 Crescimento planctônico em meio BHI, BHI sacarose e RPMI.

4.2.1 Cultura em meio BHI, BHIs e RPMI

As curvas de crescimento de SK36 e seus mutantes SKvic e SKcov, foram determinadas em meio complexo BHI e BHE respectivamente, em meio complexo acrescido de sacarose 0,1% (BHIs e BHEs) e meio RPMI 1640 (RPMI e RPMIerm).

Para isto, culturas *overnight* das cepas, foram crescidas em caldo BHI e BHE e incubadas a 37°C, 10% de CO₂. Os ensaios de crescimento foram realizados em tubos de polietileno com tampa rosqueável de capacidade de 50ml (Corning, EUA), contendo o total de 25ml de meio de cultura. A partir da cultura *overnight*, volumes específicos de cada cepa, normalizados pela absorbância (A_{550nm}) com densidade óptica (OD) inicial de 0,05, foram transferidos para tubos contendo 25ml de meio fresco pré-aquecido a 37°C e incubados de zero a nove horas (37°C;10%CO₂), sendo retirados alíquotas de 500µl de uma em uma hora para determinação das absorbâncias em BHI (A_{550nm}) ou RPMI 1640 (A_{600nm}).

4.2.2 Amostras de soro e sangue humano

As coletas de soro e sangue foram realizadas através de protocolo previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (protocolo nº 031/2012), conforme definido na Resolução 196/96 relativa à pesquisa com seres humanos (ANEXO 1).

Após esclarecimentos e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) amostras de sangue foram coletadas através de punção da veia braquial após assepsia da pele com algodão estéril embebido em álcool 70%. A coleta foi realizada por um profissional com experiência e formação na área de Biomedicina. A punção venosa foi realizada por método a vácuo, em tubos contendo anticoagulante heparina sódica (para sangue total) e tubos seco (para soro), não necessitando que indivíduo estivesse em jejum. Os tubos para soro,

foram mantidos a temperatura ambiente por 30 min, para retração do coágulo sanguíneo. Após esse período, foram centrifugados a 700 xg por 10 minutos, separadas alíquotas de 1 mL em microtubos previamente estéreis e assim estocadas a -70°C. Alíquotas de soro utilizados nos ensaios de deposição de C3, foram armazenadas em ultrafreezer, eram retiradas previamente antes do uso e mantidos em gelo até seu descongelamento total. Para os ensaios de fagocitose, as coleta de sangue foram realizadas 5 minutos antes da exposição bacteriana ao sangue.

4.2.2.1 Critérios de Inclusão

Adulto, sadio, com idade entre 20 e 40 anos, que não esteja em uso de qualquer antibiótico.

4.2.2.2 Critérios de Exclusão

Excluídos da pesquisa, adultos com problemas de saúde geral ou sob antibioticoterapia até duas semanas antes do dia da coleta de sangue. Pessoas que relatem apresentar ansiedade frente aos procedimentos de coleta de sangue serão excluídas.

4.3 Determinação da fagocitose por PMNs em sangue humano.

A frequência de fagocitose por PMNs em sangue humano foi analisada como descrito por Negrini *et al.* (2011), com algumas modificações. Para isto, cepas do tipo selvagem e respectivos mutantes, foram cultivadas como descrito no item 4.1. Em seguida, aproximadamente 100µL dessas culturas *overnight* foram transferidos para 10 mL de meio fresco e incubadas novamente sob as mesmas condições de temperatura e CO₂, até atingir a densidade óptica de 0,6 (A_{550nm}), correspondente a aproximadamente 1,0 x 10⁹ UFC/mL, ou a metade da fase exponencial de crescimento. As células foram então coletadas por centrifugação

(10.000 x g, 5 min, 4°C), descartado o sobrenadante e o volume equivalente de meio RPMI sem antibiótico foi adicionado aos tubos e assim os *pellets* foram ressuspensos delicadamente. Foram transferidos 500µL de suspensão bacteriana e homogeneizados suavemente a 500µL de sangue venoso fresco (colhido de um adulto saudável), e posteriormente incubados a 37°C e 5% CO₂ por tempos de 5, 15, 30 e 60 min. Os esfregaços das amostras foram obtidos nos tempos 5, 15, 30, 60 min de incubação, corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa e a contagem do número de PMNs com bactérias internalizadas foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico (ampliação original de 100x), por um único examinador cego (TRO) previamente treinado. Foram realizados três experimentos independentes com amostras de sangue coletadas do mesmo doador e a frequência de internalização de *S. sanguinis* e *S. mutans* foi expressa pela porcentagem de PMNs com bactérias intracelulares, em um total de 200 PMNs analisados por esfregaço.

4.4 Avaliação da ligação e C3b/iC3b do complemento

Os ensaios para análise da deposição de C3b sobre as cepas estudadas, foram realizados como descrito por Yuste et al. (2002). Para isto, volumes de 200µl de culturas de *S. sanguinis* em BHI (18 h, 37°C, 10% CO₂), foram transferidos para 5 ml de meio fresco BHI e incubados sob as mesmas condições até atingir uma absorbância de 0,3 (A_{550nm}), correspondente a aproximadamente 1,0x10⁷UFC/ml. Após a incubação foram coletados 500 µl destas culturas em microtubos de 1,5mL e assim centrifugados (11.000 rpm x 2 min), o pellet bacteriano foi lavado com 500µl de PBS (pH 7,0) por duas vezes. Em seguida, 10µl dessas suspensão bacteriana foi ressuspensas em 10µl de soro humano, diluído a 20% em PBS, em seguida os tubos foram incubados durante 30 min em banho seco 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), ressuspensas em 50 µl de solução de anticorpos policlonais IgG de cabra anti-C3 humano conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ICN, E.U.A.) diluído 1:300 em PBST.

Após incubação em gelo por 40 min, as bactérias foram lavadas por duas vezes em 300µl de PBST, centrifugadas (11.000 rpm x, 2 min) e ressuspendidas em 350µl de PBS paraformaldeído 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 por meio dos parâmetros de tamanho (FCS-Foward Scatter) e complexidade (SSC-Side Scatter) das células. População localizada abaixo de 10^1 no parâmetro SSC foram excluídas. Como controles negativos, foram analisadas bactérias tratadas nas mesmas condições com PBS ao invés de soro a 20%. Os resultados, expressos como a porcentagem de bactérias fluorescentes em comparação aos controles incubados em PBS.

4.5 Forma de análise dos resultados

Para realizar as análises estatísticas, utilizou-se o *software* BioStat 5.0. As comparações de crescimento planctônico (A550nm) entre cepas foram realizadas para cada tempo estudado, através do Teste T de Student para amostras pareadas. Para análises e comparações estatística de marcação pelo complemento, foram utilizadas as médias de três experimentos independentes realizados em triplicata, assim as médias das triplicatas foram utilizadas para as comparações entre as cepas. As análises e comparações estatísticas da frequência de fagocitose foram feitas a partir da media dos esfregaços em duplicata para cada experimento independente. As comparações entre as cepas foram realizadas utilizando-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn.

5 RESULTADOS

5.1 Crescimento planctônico das cepas *S. sanguinis* e *knockouts*

Como apresentado em estudos anteriores pelo nosso grupo (Moraes *et al.*, 2014), a cepa mutante SKvic exibe um fenótipo diferente de crescimento planctônico quando comparado à cepa progenitora SK36 e mutante SKcov em crescimento planctônico de rotina. Apesar de ocorrer precipitação das células durante o crescimento *overnight*, as células de SK36 e SKcov voltam a suspensão uniforme quando homogeneizadas, enquanto que a suspensão de SKvic possui característica de agregados (Figura 1).

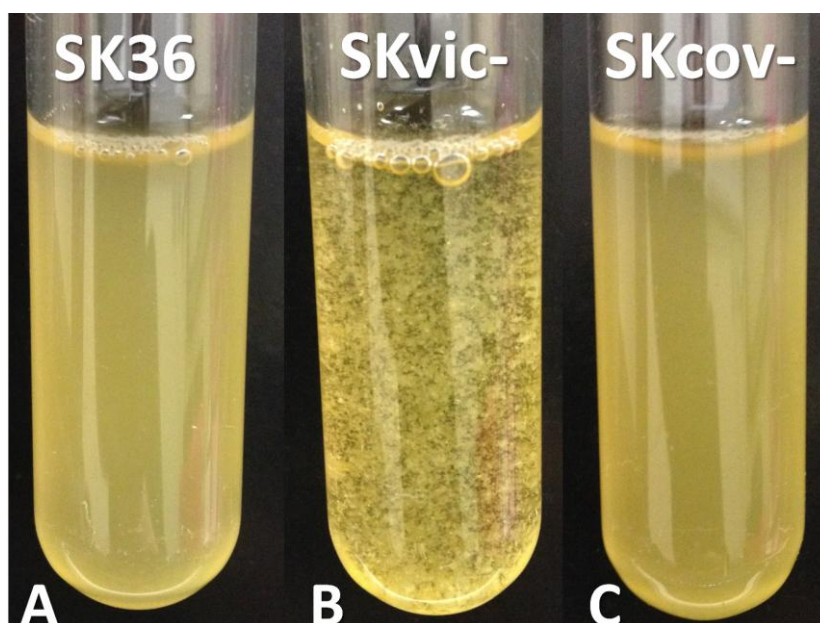


Figura 1: Crescimento planctônico *overnight* em meio de cultura BHI, 18h 37°C 10% CO₂. (A) Cepa selvagem SK36, células homogeneamente dispersas após agitação em vórtex; (B) SKvic, caracterizada pela formação de grumos dispersos pelo meio após agitação em vórtex (C) SKcov homogeneamente dispersa no meio de cultura, como da cepa selvagem.

As curvas de crescimento, das cepas *S. sanguinis* SK36 e respectivos mutantes SKvic e SKcov, foram comparadas em meio BHI (Figura 2), BHI sacarose 0,1% (Figura 3) e meio RPMI (Figura 4).

As Figuras 2 e 3 indicam crescimento mais lento da cepa SKcov em meio BHI e BHI sacarose 0,1% em relação às outras cepas. SKcov leva um tempo maior para atingir a fase logarítmica de crescimento, comparada às outras cepas, embora atinja um número de células equivalente ao das outras cepas por volta de 8 h de incubação. Ao avaliarmos o crescimento em meio RPMI (Figura 4), identificamos uma lentidão no crescimento da cepa SKcov. Todas as cepas em meio RPMI atingem um número menor de células (Figura 4), quando comparadas com os outros meios (Figura 2 e 3).

A DO de 0,3 foi selecionada para comparação entre cepa WT e mutantes *knockouts*, uma vez que esta absorbância corresponde a aproximadamente metade da fase logarítmica entre todas as cepas *S. sanguinis* analisadas.

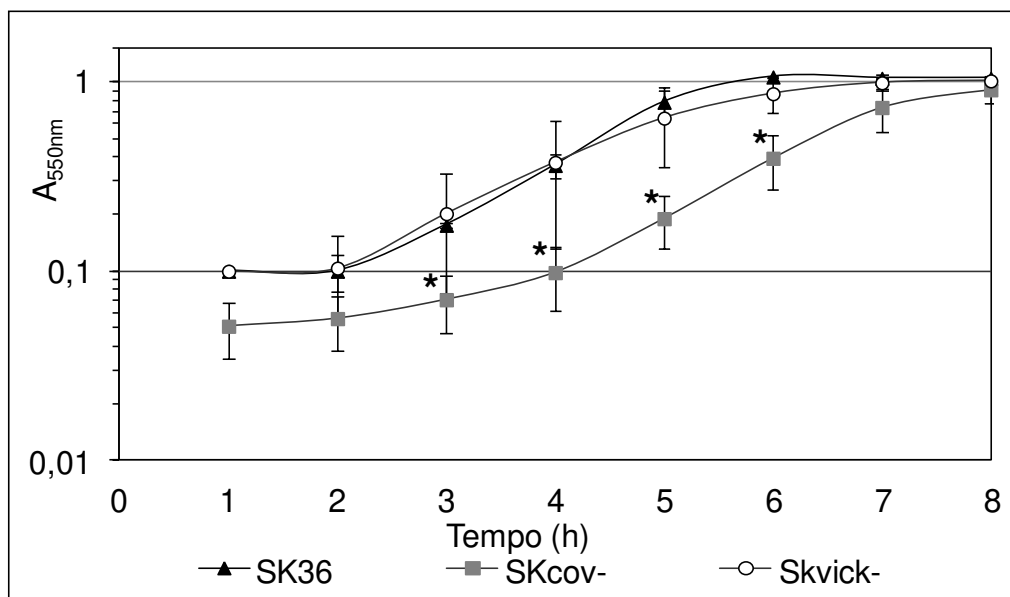


Figura 2: Curvas de crescimento das cepas *S. sanguinis* SK36 e respectivos mutantes SKcov e SKvic. Crescimento planctônico em meio BHI; As fases logarítmica e estacionária para SK36 e SKvic ocorreram no períodos de 2 a 6 e 6 a 8 horas de crescimento, para a cepa SKcov os mesmos períodos ocorrem tardiamente iniciando em 4h sua fase logarítmica e atinge a fase estacionária com 8 horas. Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes realizados em duplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (Teste T Student, * $p < 0,05$).

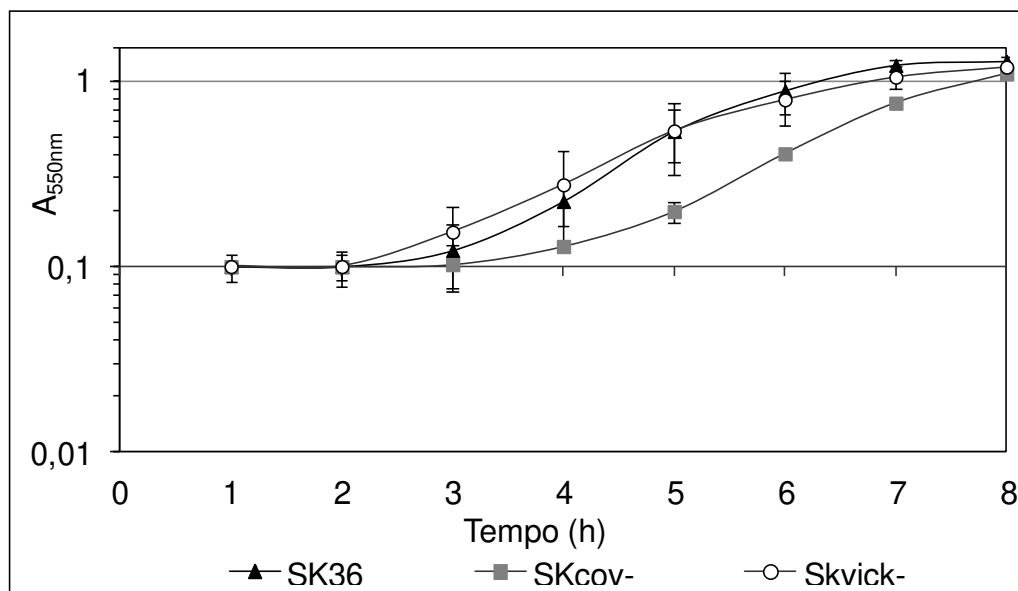


Figura 3: Curvas de crescimento das cepas *S. sanguinis* SK36 e respectivos mutantes SKcov e SKvic. Crescimento planctônico em meio BHI acrescidos de sacarose a 0,1%; As fases logarítmica e para SK36 e SKvic; Já o mutante SKcov demora uma hora a mais para atingir sua fase estacionária, iniciada em 8 horas de crescimento. Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes realizados em duplicata.

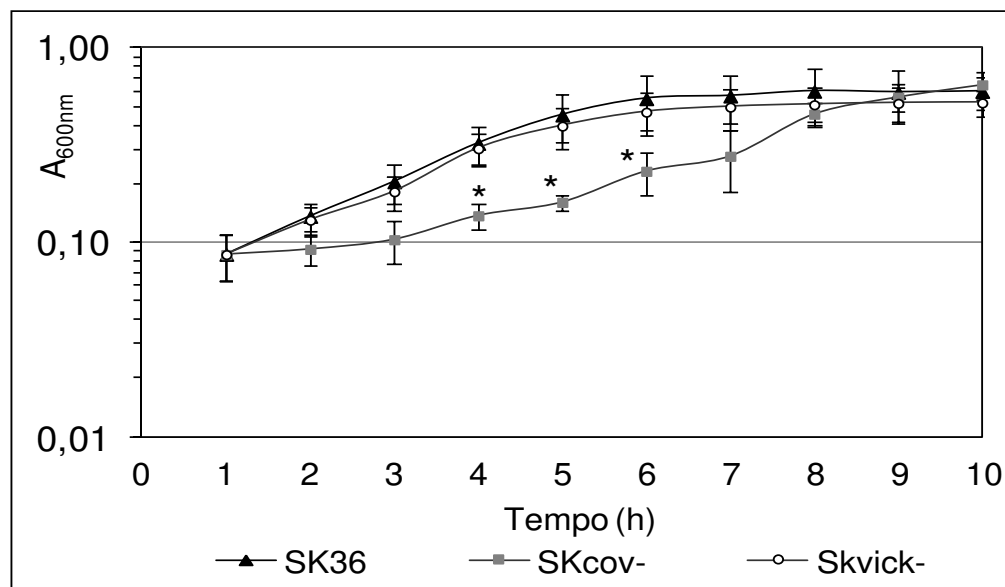


Figura 4: Curvas de crescimento das cepas *S. sanguinis* SK36 e respectivos mutantes SKcov e SKvic. Crescimento planctônico em meio RPMI; As fases logarítmica e estacionária corresponderam, respectivamente, para SK36 e SKvic períodos de 1 hora e 30 min a 6 e 6 a 10 horas de crescimento. Já o mutante SKcov, demora mais para atingir as mesmas fases (fase logarítmica de 3 a 10 horas de crescimento, e início da fase estacionária em 10 horas). Os valores correspondem às médias de três experimentos independentes realizados em duplicata. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (Teste T Student, *p<0,05).

5.2 Ensaios de marcação pelo complemento sobre a superfície de cepas de *S. sanguinis* e mutantes *knockouts*

A deposição de C3b nas cepas SK36, SKvic, SKcov (Figura 5) é até três vezes menor (7,22; 5,65; 9,4 e 7,4%) quando comparadas à cepa de referência UA159 (média de deposição de 21,49%) em exposição ao soro a 2%. Em ensaios onde a concentração de soro foi aumentada a 20% (Figura 6), houve uma menor diferença entre a cepa selvagem (WT) de *S. sanguinis* SK36 (37,33%) quando comparadas a cepa WT de *S. mutans* UA159 (46,26%). Entretanto, a cepa mutante SKvic demonstrou deposição de C3b/iC3b significativamente menor quando comparada à cepa selvagem SK36 (Kruskal-Wallis; $p < 0,05$).

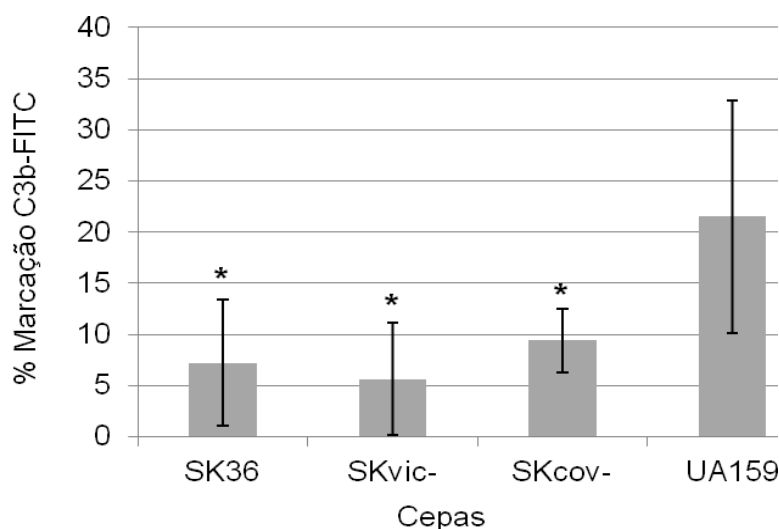


Figura 5: Porcentagem de ligação de C3b/iC3 à superfície das cepas de SK36, mutantes SKvic, SKcov incubadas com soro 2%. As colunas representam médias de três experimentos independentes realizados em triplicata. As barras indicam os desvios padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (Kruskal-Wallis seguido de Dunn; $p < 0,05$) entre as cepas *S. sanguinis* em relação a *S. mutans*.

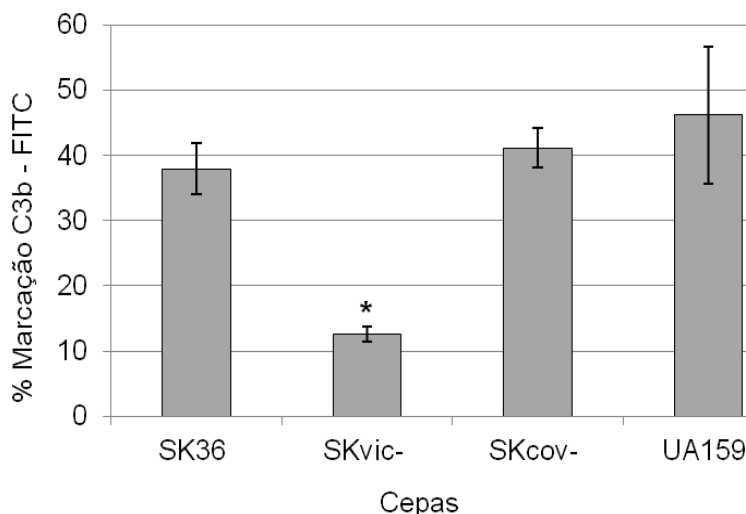


Figura 6: Cepas incubadas com soro a 20% durante 30 min. As colunas representam médias de três experimentos independentes realizados em triplicata. As barras indicam os desvios padrão. Os asteriscos representam diferenças estatísticas significantes (Kruskal-Wallis seguido de Dunn; $p < 0.05$) entre as cepas de *S. sanguinis*.

5.3 A marcação pelo complemento sobre as cepas *S. sanguinis* é menor que a marcação em *S. mutans* UA159

A porcentagem de marcação de C3b das cepas de *S. sanguinis*, foi comparada com a cepa de *S. mutans* UA159 em ensaios de citometria de fluxo. Como observado na figura 5B, a porcentagem de marcação referente a cepa SK36 é de aproximadamente 80% da marcação de UA159 ambas tratadas com soro humano a 20% nas mesmas condições experimentais. Para verificação de um padrão de deposição de C3b, representativo da espécie *S. sanguinis*, incluímos outras 6 cepas de *S. sanguinis* isoladas clínicas de amostras bucais ou de sangue e utilizamos como referência as cepas UA159 e seu mutante *knock-out* UAcov (Figura 7).

Após análise dos resultados obtidos das aquisições de três experimentos independentes, observamos que a cepa selvagem SK36, quando comparada com a cepa de referência UA159, mantém seu padrão de aproximadamente 60% de marcação de C3b. Das cepas *S. sanguinis* utilizadas neste estudo (SK330, SK72, SK49, SK115, SK353 e SK1056) 85,7% apresentam deposição de C3b

significativamente menor que na cepa *S. mutans* UA159 (Kruskal Wallis, $p < 0,05$). Estes dados indicam que a espécie *S. sanguinis* é menos susceptível à opsonização pelo complemento do que a espécie *S. mutans*.

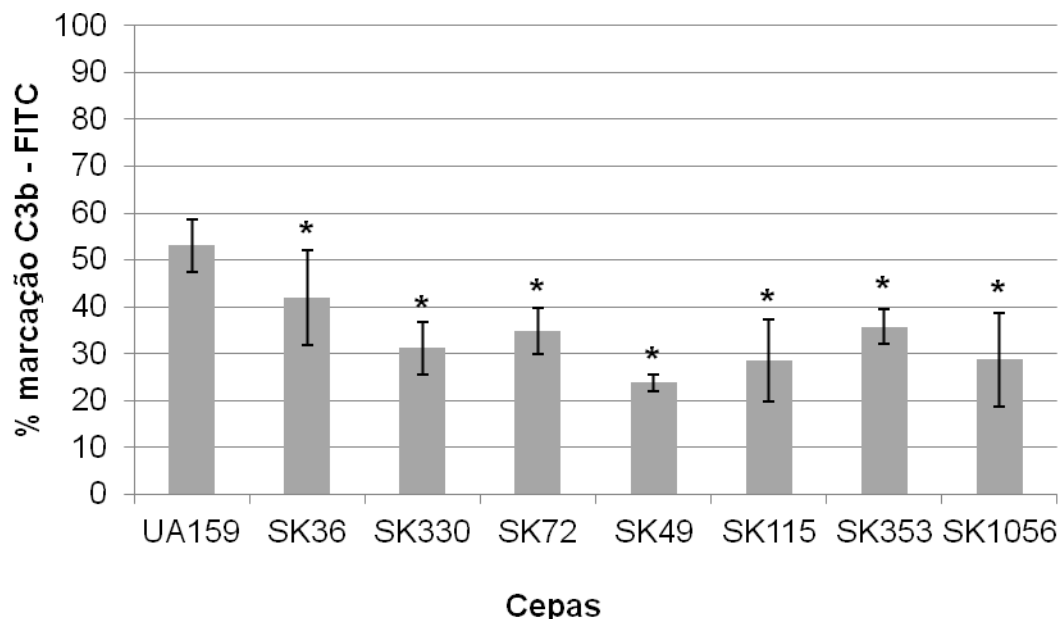


Figura 7: Comparação das porcentagens de deposição de C3b entre cepas *S. sanguinis* isoladas de biofilme dental (SK36, SK72, SK49 e SK115) ou sangue (SK330, SK353 e SK1056) e *S. mutans* UA159. As colunas representam médias de triplicatas de um experimento representativo. Diferenças significativas na porcentagem de cepas em relação à SM UA159 foram detectadas utilizando-se teste Kruskal Wallis: * $p < 0,05$.

5.4 Análise da frequência de fagocitose por PMN por microscopia de luz

As Figuras 8 e 9 representam frequência de internalização das cepas *S. sanguinis* e *S. mutans* por PMN em sangue humano. Observa-se que entre as cepas selvagens (SK36 e UA159) ocorreu uma fagocitose rápida durante o tempo de 5 min de exposição bacteriana ao sangue. Entretanto, enquanto o mutante *covR*, obtido em *S. mutans* UA159, é significativamente menos fagocitado do que a cepa selvagem (Figura 9), a inativação destes genes em *S. sanguinis* SK36 não afeta significativamente sua fagocitose (Figura 8).

A Figura 10 ilustra internalização das cepas SK36, SKvic e SKcov por PMN em sangue humano. Apesar do grande tamanho das cadeias de SKvic, esta cepa foi fagocitada com eficiência semelhante à da cepa selvagem SK36.

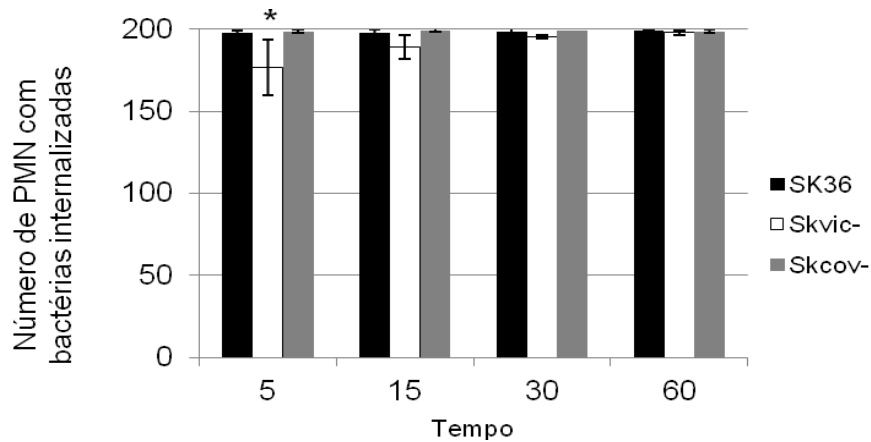


Figura 8: Efeito da inativação dos genes *vicK* e *covR* na fagocitose de *S. sanguinis* por PMN em sangue humano. Os esfregaços foram analisados por microscopia de luz (aumento 100X). Colunas representam médias do número de PMN com bactérias internalizadas entre o total de 200 PMN contados, obtidas em três experimentos independentes (n=3); as barras indicam os desvios padrão. Diferenças estatísticas entre as cepas selvagens e seus respectivos mutantes estão representados por asteriscos; Kruskal-Wallis: * p<0,05).

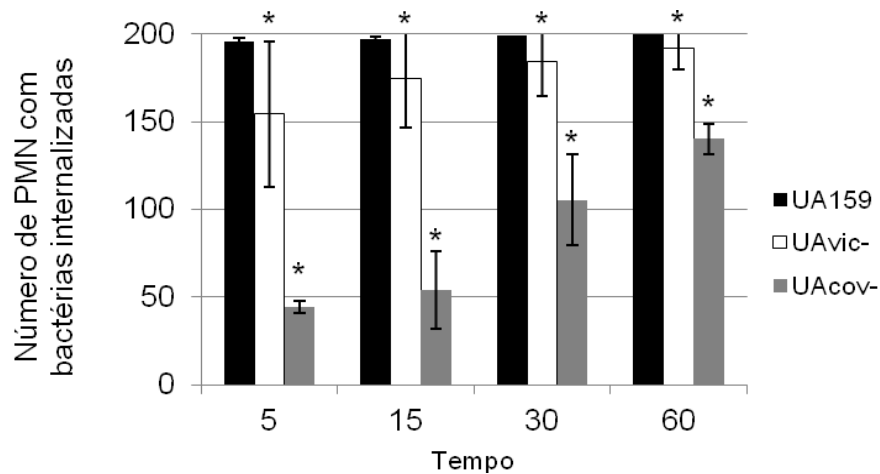


Figura 9: Efeito da inativação dos genes *vicK* e *covR* na fagocitose de *S. mutans* por PMN em sangue humano. Os esfregaços foram analisados por microscopia de luz (aumento 100X). Colunas representam médias do número de PMN com bactérias internalizadas entre o total de 200 PMN contados, obtidas em três experimentos independentes (n=3); as barras indicam os desvios padrão. Diferenças estatísticas entre as cepas selvagens e seus respectivos mutantes estão representados por asteriscos; Kruskal-Wallis: * p<0,05).

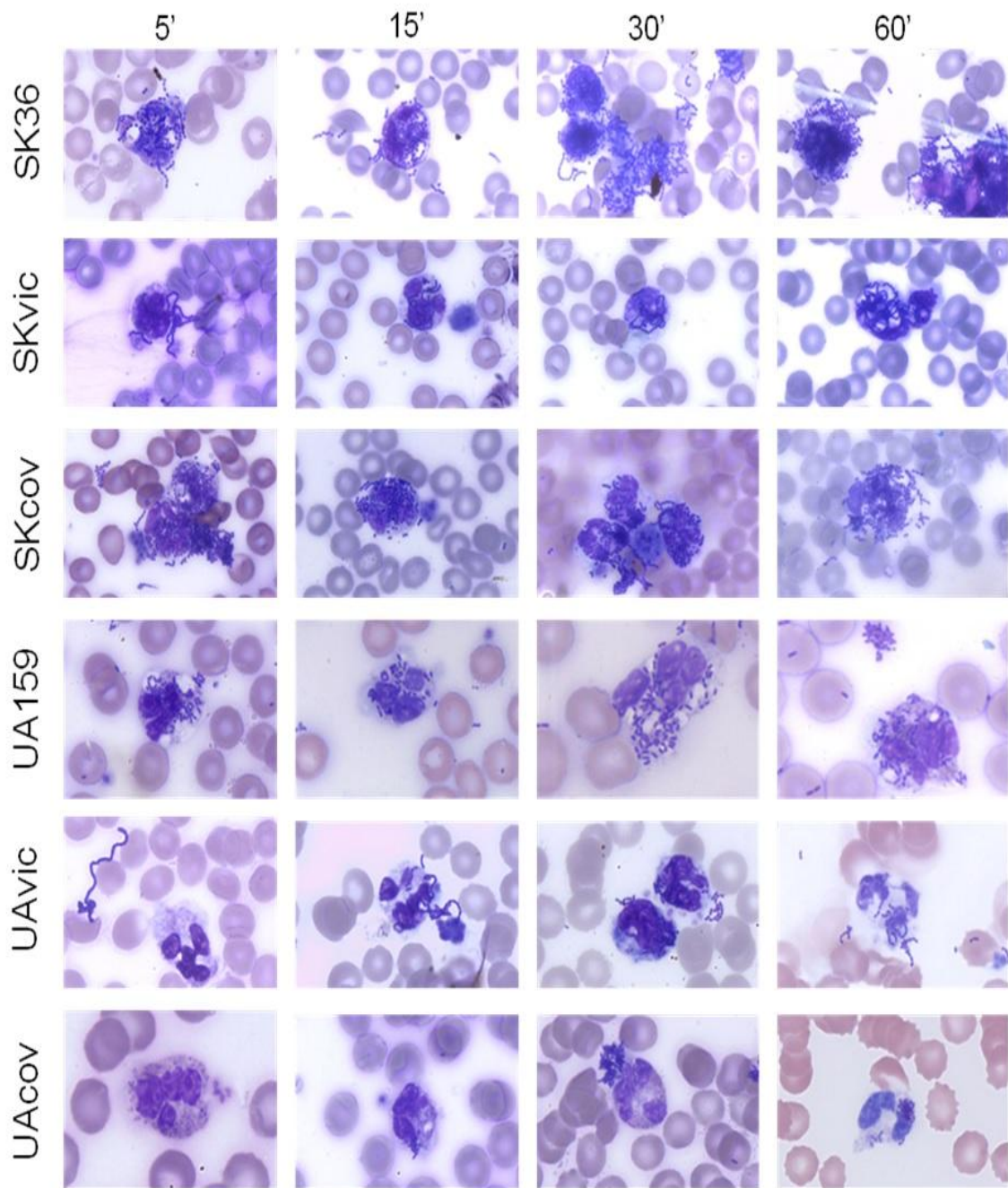


Figura 10: Imagens representativas de PMNs de sangue humano internalizados em diferentes tempos de exposição das cepas *S. sanguinis* SK36, SKvic, SKcov e cepas de *S. mutans* UA159, UAvic e UAcov. As cepas selvagens SK36 e UA159 e mutantes *knockouts* SKvic e SKcov, tiveram uma alta frequência de internalização desde o tempo inicial de exposição (5 min), o que difere dos mutantes *knockouts* UAvic e UAcov com uma frequência de internalização menor no mesmo período de tempo.

6 DISCUSSÃO

Streptococcus sanguinis são frequentemente associados à endocardite bacteriana, visto que é a espécie de estreptococos mais frequentemente encontrada em sangue (Douglas *et al.*, 1993). Porém são os principais colonizadores primários dos biofilmes dentários considerados microrganismos comensais benéficos dos dentes por causa de capacidade de inibir patógenos da cárie dentária (Kreth *et al.*, 2005) e doenças periodontais (Jenkinson & Lamont RJ, 2005). Esta espécie tem papel importante no estabelecimento da microbiota dos dentes, na qual bactérias do gênero *Streptococcus* compreendem cerca de 60 a 80% dos microrganismos nos períodos iniciais de 4 a 8h de formação dos biofilmes (Rosan & Lamont, 2000). Os sistemas regulatórios de dois componentes (SDCs) são componentes críticos de determinantes de virulência de bactérias patogênicas. Estes sistemas permitem às bactérias detectarem diferentes condições de estresse durante todos os estágios de colonização e infecção do hospedeiro permitindo alterações rápidas no padrão de transcrição de genes necessários para sua adaptação fisiológica e persistência no seus nichos. SDCs que codificam genes de escape a fatores de defesa do hospedeiro e outros fatores de virulência são utilizados por *Streptococcus pyogenes* do Grupo A (GAS), como durante diversos processos de infecção da mucosa orofaríngea e outros nichos do hospedeiro (Churchward, 2007). Estes incluem o SDCCovRS, composto pela proteína sensora CovS e o regulador de resposta CovR. Em GAS, a proteína sensora fosforila CovR, o qual atua como repressor de diversos genes. Em resposta a estímulos do hospedeiro, como por exemplo a presença do peptídeo catiônico LL-37, CovS atua defosforilando CovR induzindo assim a expressão de genes de virulência reprimidos por CovR (Churchward, 2007; Gryllo *et al.*, 2008). Diferente de *S. pyogenes*, *S. sanguinis* não contém o gene que codifica a proteína sensora de membrana extracelular (CovS) (Churchward, 2007; Xu *et al.* 2007). Portanto, é necessário identificar em *S. sanguinis*, qual é a proteína sensora responsável pela sua fosforilação e defosforilação. Ainda é preciso indentificar em

S. sanguinis quais são os genes diretamente regulados por CovR (Agrahari *et al.*, 2013).

A espécie *S. sanguinis* apresenta um vasto número de proteínas de superfície celular comparada a outras espécies de estreptococos (Xu *et al.* 2007), o que talvez explique sua grande capacidade de colonizar as superfícies dentárias recobertas por saliva ou outros tecidos do hospedeiro, como o endocardio. Diversas espécies de *Streptococcus* apresentam proteínas de parede importantes para o escape a fatores de defesa do hospedeiro (Banas & Vikerman, 2003; Smith & Mattos-Graner, 2008; Bowen & Koo, 2011). Por outro lado, o sistema imune utiliza de opsoninas para facilitar o reconhecimento e internalização por fagócitos através de receptores de superfície. O revestimento de um microrganismo com moléculas que favorecem seu reconhecimento e internalização por fagócitos é conhecido como opsonização. Sua ligação específica, a receptores de superfície celular, é o que caracteriza o primeiro passo da fagocitose. As principais opsoninas incluem anticorpos (IgG) e proteínas do complemento, principalmente C3B/iC3b anticorpos e C3b do complemento (Abbas & Lichtman, 2007; Ricklin & Lambris, 2007).

Embora a fagocitose de bactérias Gram-positivas também possa ocorrer de forma independente de opsoninas, na qual é mediada por receptores de reconhecimento, como receptores de manose, receptores *scavenger* (Draper *et al.*, 2006), a deficiência do complemento tem grande impacto na sobrevivência de animais a infecções por bactérias do gênero *Streptococcus* spp. Diversos processos subsequentes à fagocitose ativam sistemas de destruição no interior dos fagossomos através de enzimas hidrolíticas e compostos oxidativos altamente tóxicos (Silverstein, 2003). Estudos indicam que cepas de uma mesma espécie variam quanto à susceptibilidade de internalização por fagócitos. Por exemplo, cepas de *S. mutans* do sorotipo *k*, frequentemente envolvidas em endocardite bacteriana, são menos eficientemente internalizadas por neutrófilos do sangue, o que parece estar associada a diferenças nos componentes da parede celular em comparação com cepas menos invasivas (Nakano *et al.*, 2004). No presente estudo, observamos diversidade na susceptibilidade de cepas *S. sanguinis* à

deposição de C3b (Fig.7) e estudos futuros serão necessários para avaliar diferenças na susceptibilidade à fagocitose na presença de sangue.

6.1 Os fatores regulados pelos sistemas VicK e CovR 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 (genes *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). A inativação dos SDCs VicRK e CovR promovem alterações de biogênese e divisão da parede celular em espécies de estreptococos como *S. mutans*, *S. pneumoniae* e *S. sanguinis* (Ng *et al.*, 2005; Senadheera *et al.*, 2005; Duque *et al.*, 2011; Stipp *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2014), através da regulação de genes relacionados à biogênese do envelope celular, formação de biofilmes e resposta ao estresse oxidativo. Genes que compõem os regulons do sistema VicRK e CovR variam entre as espécies, mas estão normalmente implicados em mecanismos de colonização do hospedeiro e formação de biofilmes nas espécies (Ng *et al.*, 2005; Senadheera *et al.*, 2005; Duque *et al.*, 2011; Stipp *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2014).

No presente estudo, observamos em *S. sanguinis* e mutantes *knock-out* *vick* e *covR* uma pequena redução na susceptibilidade à deposição de C3b do complemento, quando expostos a concentrações variáveis de soro humano. Estes dados diferem dos dados obtidos em *S. mutans*, no qual a porcentagem de deposição de C3b foi reduzida em cerca de 50% nos mutantes knockout *vick* e *covR*, quando comparadas à cepas padrão UA159. (Alves *et al.*, 2013). Análises das médias de intensidade de fluorescência de C3b marcado com anticorpos fluorescentes seriam necessárias para a melhor quantificação da deposição de C3b nas superfícies das cepas de *S. sanguinis*. Em SK36, foi verificado que a inativação de *vick* diminui a expressão de proteínas de biogênese de parede celular, incluindo-se a hidrolase de mureína (SSA_0094, SSA_0304), a GbpB (também conhecida como PcsB) uma outra proteína de biogênese de membrana (SSA_1543), e aumenta a expressão da proteína Cgt (SSA_1324), responsável também pela biogênese de membrana (Moraes *et al.*, 2014). É possível, portanto, que algumas destas proteínas estejam implicadas no escape à opsonização pelo complemento, como verificado para LytB/C em *S. pneumoniae* (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). Análises do genoma de SK36 e de outras cepas de *S. sanguinis* são ainda necessárias para identificar outras proteínas envolvidas no escape ao complemento, uma vez que verificamos entre diversos isolados de *S. sanguinis*, uma menor susceptibilidade à deposição do complemento em comparação com *S. mutans* (Figura 7). A menor susceptibilidade de *S. sanguinis* à deposição do complemento quando comparada à *S. mutans*, possivelmente contribui para a maior capacidade desta espécie de causar infecções sistêmicas, conforme citado anteriormente, um SDC bem estudado em GAS é o CovRS, em que estudos mostraram que CovR reprime o gene *speB*, codificador de uma cisteína-protease que afeta a virulência em diferentes estágios da infecção através da degradação de glicoproteínas de matriz extracelular, de IL-1 β e da liberação de proteínas de superfície de *S. pyogenes* (Hytönen *et al.*, 2001). CovRS também regula os genes envolvidos na síntese da cápsula de ácido hialurônico, genes esses necessários para a disseminação do GAS (Heath *et al.*, 1999; Treviño *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2013). O SDC CovSR de GAS também regula fatores de escape à

opsonofagocitose mediada pelo complemento (Agrahari *et al.*, 2013). Uma cepa de *S. pyogenes* isolada de paciente com fasciite necrosante (AP53), a qual contém uma mutação natural no gene *covS*, tem baixa susceptibilidade à deposição de C3b e à fagocitose, sendo a deposição de C3b fortemente aumentada quando esta cepa é complementada com a cópia intacta de *covS* (Agrahari *et al.*, 2013). A inativação *covR* em AP53 promoveu ainda aumento de mais de 100% na ligação desta cepa a proteínas reguladoras do complemento C4BP e Fator H, as quais se ligam a glicosaminoglicanos das células humanas inibindo a formação da convertase de C3 e a deposição de C3b (Dave *et al.*, 2004). A participação de *covRS* na deposição de C3b foi confirmada na cepa NS931, indicando o papel deste SDC no escape à opsonização em de GAS.

Na espécie *S. pneumoniae*, variações na síntese de diferentes tipos de cápsula polissacarídica são reconhecidas como um dos principais fatores de escape à opsonização pelo complemento (Hyams *et al.*, 2013). A formação do biofilme evita a deposição de C3b e fagocitose em *S. pneumoniae* (Domenech *et al.*, 2013). Em *S. sanguinis*, o SDC VicRK regula genes implicados na formação de biofilme, e em *S. mutans*, ambos SDCs VicRK e CovR são requeridos para função semelhante (Duque *et al.*, 2011; Stipp *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2014).

6.2 Frequência de fagocitose por PMNs

A ativação da imunidade pelo complemento é um mecanismo muito eficiente da resposta imune envolvidos no processo de fagocitose de microrganismos patogênicos. A inativação dos sistemas VicRK e CovR em *S. mutans* promove reduções significativas na fagocitose por PMNs em sangue humano (Negrini *et al.*, 2012). Porém, diferente de *S. mutans* em que as cepas *knockout* (UAvic e UAcov) apresentaram reduções significativas na fagocitose pelos PMNs, o mesmo não ocorreu em *S. sanguinis*, visto que apenas a mutante *knockout* SKvic apresentou redução significativa em relação à cepa selvagem SK36, igualando-se a essa após 60 minutos de exposição aos PMNs. A redução de deposição de C3b na superfície bacteriana tem sido associada a reduções

significativas na fagocitose soro-dependente por PMNs em *S. mutans* (Alves *et al.*, 2013) e *S. pyogenes* (Agrahari *et al.*, 2013). Porém em nosso estudo, não pudemos verificar qualquer efeito da inativação de *covR* ou *vick* na fagocitose por PMNs (Figura 8) Curiosamente, o mutante de *vick* obtido em *S. mutans* UA159 (UAvic) também não demonstrou redução significativa na susceptibilidade à fagocitose, diferindo de estudos prévios realizados em diferentes condições com este mutante (Negrini *et al.*, 2012; Alves, 2013). Variações entre soros e das características de PMNs de diferentes voluntários poderiam explicar estas incongruências. Assim, novos ensaios com diferentes amostras de soro precisarão ser realizadas para elucidar este ponto.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- 1) Diversas cepas de *S. sanguinis* são menos susceptíveis à deposição de C3b do complemento quando comparadas à cepa *S. mutans* UA159
- 2) A inativação de *vic*, reduz a deposição de iC3b/C3b em *S. sanguinis* SK36.
- 3) A inativação de *covR* não afeta a deposição de iC3b/C3b em *S. sanguinis* SK36.
- 4) Mutantes SKvic e SKcov não diferem significativamente da cepa selvagem SK36 quanto à fagocitose por PMN em sangue humano.

REFERÊNCIAS

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, and Dewhirst FE. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 43:5721–5732.
2. Abbas, A. K., Lichtman, A.H. *Imunologia Básica*. Editora Elsevier; 2007.
3. Ahn SJ, Burne RA (2007). Effects of oxygen on biofilm formation and the AtlA autolysin of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 189: 6293–6302.
4. Ahn SJ, Burne RA. (2006) The *atlA* operon of *Streptococcus mutans*: role in autolysin maturation and cell surface biogenesis. *J Bacteriol.* 188(19):6877–88.
5. Alves LA, (2013) Estudo da participação dos reguladores de transcrição gênica *vicRK* e *covR* na evasão de *Streptococcus mutans* ao sistema complemento, UNICAMP/FOP.
6. Banas JA and Vickerman MM. (2003). Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* 14:89-99.
7. Biswas S and Biswas I. (2006). Regulation of the glucosyltransferase (*gtfBC*) operon by *CovR* in *Streptococcus mutans*. *J.Bacteriol.* 188:988-998.
8. Bowen WH, Koo H. (2011) Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 45(1):69-86.
9. Chiu B (1999) Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J* 138: 534–536.
10. Churchward G. (2007) The two faces of Janus: virulence gene regulation by *CovR/S* in group A streptococci. *Mol. Microbiol.* 64, 34–41
11. Crump KE, Bainbridge B, Brusko S, Turner LS, Ge X, Stone V, Xu P, Kitten T. (2014) The relationship of the lipoprotein *SsaB*, manganese and superoxide dismutase in *Streptococcus sanguinis* virulence for endocarditis. *Molecular Microbiology* 92(6), 1243–1259.
12. Dalton TL, Hobb RI, and Scott JR. (2006). Analysis of the role of *CovR* and *CovS* in the dissemination of *Streptococcus pyogenes* in invasive skin disease. *Microb.Pathog.* 40:221-27.
13. Dave S, Pangburn MK, Pruitt C, McDaniel LS. (2004) Interaction of human factor H with *PspC* of *Streptococcus pneumoniae*. *Indian J Med Res.*; 119 Supl:66-73

14. Diaz S, Fragione J, Chapin FS, Tilman D, (2006). Biodiversity Loss Threatens Human Well-Being. *PLoS Biol.* Aug 2006; 4(8): e277.
15. Domenech M, Ramos-Sevillano E, García E, Moscoso M, Yuste J. (2013) Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.*; 81(7):2606-15.
16. Douglas CW, Heath J, Hampton KK, Preston FE (1993). Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J Med Microbiol* 39: 179–182.
17. Dubrac S, Msadek T (2004). Identification of Genes Controlled by the Essential YycG/YycF Two-Component System of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*; 186(4): 1175–1181.
18. Duque C, Stipp RN, Wang B, Smith DJ, Hofling JF, Kuramitsu HK, Duncan MJ, Mattos-Graner RO. (2011) Downregulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm formation and cell surface characteristics of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 79:786-796.
19. Ge X, Kitten T, Chen Z, Lee SP, Munro CL, Xu P. (2008) Identification of *Streptococcus sanguinis* genes required for biofilm formation and examination of their role in endocarditis virulence. *Infect Immun.*; 76: 2551-2559.
20. Gryllos I, Grifantini R, Colaprico A, Cary ME, Hakansson A, Carey DW, Suarez-Chavez M, Kalish LA, Mitchell PD, White GL, Wessels MR; (2008). PerR Confers Phagocytic Killing Resistance and Allows Pharyngeal Colonization by Group A *Streptococcus*. ed. *PLoS Pathogens* 2008;4(9):e1000145. doi:10.1371/journal.ppat.1000145.
21. Haas KM, Hasegawa M, Steeber DA, Poe JC, Zabel MD, Bock CB (2002) Complement receptors CD21/35 link innate and protective immunity during *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating IgG3 antibody responses. *Immunity.*; 17(6):713-23
22. Heath A, DiRita VJ, Barg NL, and Engleberg NC. (1999) A twocomponent regulatory system, CsrR-CsrS, represses expression of three *Streptococcus pyogenes* virulence factors, hyaluronic acid capsule, streptolysin S, and pyrogenic exotoxin B. *Infect. Immun.* 67, 5298–5305
23. Herzberg MC, Brintzenhofe KL, Clawson CC. (1983) Aggregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun.*; 39:1457-1469.

24. Herzberg MC, Gong K, MacFarlane GD, et al. (1990) Phenotypic characterization of *Streptococcus sanguis* virulence factors associated with bacterial endocarditis. *Infect Immun*;58:515-522.
25. Herzberg MC, Nobbs A, Tao L, Kilic A, Beckman E., Khammanivong A, Zhang Y. (2005). Oral streptococci and cardiovascular disease: searching for the platelet aggregation-associated protein gene and mechanisms of *Streptococcus sanguis*-induced thrombosis. *J Periodontol*. 76: 2101-2105.
26. Hohwy J, Reinholdt J, Kilian M. (2001) Population dynamics of *Streptococcus mitis* in its natural habitat. *Infect Immun*. 69(10):6055-63.
27. Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. (2010) The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun*.; 78(2):704-15.
28. Hyams C1, Trzcinski K, Camberlein E, Weinberger DM, Chimalapati S, Noursadeghi M, Lipsitch M, Brown JS (2013). *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype invasiveness correlates with the degree of factor H binding and opsonization with C3b/iC3b. *Infect Immun*. Jan;81(1):354-63.
29. Jenkinson HF and Lamont RJ (2005) Oral microbial communities in sickness and in health., *Trends Microbiol*. Dec;13(12):589-95. Epub 2005 Oct 7.
30. Jenkinson HF, Lamont RJ. (2005) Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 13(12):589-95.
31. Jorge, A.O.C. Princípios da microbiologia e imunologia. Editora Santos; 2010.
32. Jung CJ, Zheng QH, Shieh YH, Lin CS and Chia JS (2009). *Streptococcus mutans* autolysin AtlA is a fibronectin-binding protein and contributes to bacterial survival in the bloodstream and virulence for infective endocarditis. *Molecular Microbiology*.74:888–902.
33. Kang YS, Do Y, Lee HK, Park SH, Cheong C, Lynch RM, Loeffler JM, Steinman RM, and Park CG. (2006). A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell* 125:47–58.
34. Kolenbrander PE, London J, (1993). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol*. Jun 1993; 175(11): 3247–3252.
35. Koren O, Spor A, Felin J, Fak F, Stombaugh J, (2011) Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 4592–4598.

36. Kreth J, Merritt J, and Qi F. (2005). Competition and Coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the Dental Biofilm. *Journal of bacteriology*.187:7193–7203.
37. Kreth J, Merritt J, and Qi F. (2009). Bacterial and host interactions of oral streptococci." *DNA Cell Biol*. 28: 397-403.
38. Kreth J1, Merritt J, Shi W, Qi F. (2005) Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol*. Nov;187(21):7193-203.
39. Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W. (2007) Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev*.; 71: 653-670.
40. Lambris JD, Ricklin D, Geisbrecht BV., (2008) Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol*.feb;6(2):132-42.
41. Lamy MC, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, Pellegrini E, Glaser P, Kunst F, Msadek T, Trieu-Cuot P, Poyart C, (2004) CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence, *Molecular Microbiology* 54: 1250–1268
42. Liang Z, Zhang Y, Agrahari G, Chandras V, Ginton K, Donahue DL, Balsara RD, Ploplis VA, and Castellino FJ. (2013) A natural inactivating mutation in the CovS component of the CovRS regulatory operon in a pattern D *Streptococcus pyogenes* strain influences virulence-associated genes. *J. Biol. Chem*. 288, 6561–6573.
43. Marsh PD. (2003) Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149: 279-294.
44. Marsh, P., Martin, P. (2005). *Microbiologia oral*. São Paulo: Editora Santos, 4ª Edição.
45. Mattos-Graner RO, Jin S, King WF, Chen T, Smith DJ, Duncan MJ (2001). Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect Immun* 69: 6931–6941.
46. Mitchell TJ. (2003) The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol*. Dec;1(3):219-30. Review.
47. Moraes JJ, Stipp RN, Harth-Chu EN, Camargo TM, Höfling JF, Mattos-Graner RO; (2014) The two-component system VicRK regulates functions associated with the establishment of *Streptococcus sanguinis* in biofilms. *Infect Immun*. Dec;82(12):4941-51.

48. Mylonakis, E., and S. B. Calderwood. (2001). Infective endocarditis in adults. *N. Engl. J. Med.* 345:1318–1330.
49. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. (2004) Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. *J Clin Microbiol.*; 42: 198-202.
50. Negrini TC, Duque C, Vizoto NL, Stipp RN, Mariano FS, Höfling JF, Graner E, Mattos-Graner RO, (2011) Influence of VicRK and CovR on the interactions of *Streptococcus mutans* with phagocytes; *Oral Diseases*
51. Negrini TC, Duque C, Vizoto NL, Stipp RN, Mariano FS, Höfling JF, Graner E, Mattos-Graner RO (2012) Influence of VicRK and CovR on the interactions of *Streptococcus mutans* with phagocytes., *Oral Dis.* Jul;18(5):485-93.
52. Ng WL, Tsui HC, Winkler ME (2005). Regulation of the *pspA* virulence factor and essential *pcsB* murein biosynthetic genes by the phosphorylated VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 187: 7444–7459.
53. Nyvad B, and Kilian M, (1987). Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand. J. Dent. Res.* 95:369–380.
54. Raghavan V. and Groisman EA. (2010). Orphan and hybrid two-component system proteins in health and disease. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 226-31.
55. Ramos-Sevillano E, Moscoso M, García P, García E, Yuste J., (2011) Nasopharyngeal Colonization and Invasive Disease Are Enhanced by the Cell Wall Hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS ONE* 6(8): e23626. journal.pone.0023626
56. Ricklin D, Lambris JD. (2007) Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.* 25(11):1265-75.
57. Rosan B, Lamont RJ. (2000) Dental plaque formation. *Microbes Infect.*; 2: 1599-1607.
58. Schachtele CF, Nobbs A, Zhang Y, Costalonga M, and Herzberg MC. (2007). Oral streptococci: commensals and opportunistic pathogens, p. 411– 462. *In* R. M. Hakenbeck and S. Chhatwal (ed.), *Molecular biology of streptococci*. Horizon Bioscience, Norwich, United Kingdom.
59. Senadheera MD, Guggenheim B, Spatafora GA, Huang YC, Choi J, Hung DC, Treglown JS, Goodman SD, Ellen RP, and Cvitkovitch DG. (2005). A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects *gtfBCD*,

gbpB, and *fff* expression, biofilm formation, and genetic competence development. J Bacteriol. 187:4064-4076.

60. Silverstein AM (2003). Darwinism and immunology: from Metchnikoff to Burnet. Nat Immunol.; 4: 3-6.
61. Smith DJ and Mattos-Graner RO, (2008). Secretory immunity following mutans streptococcal infection or immunization. Curr.Top.Microbiol.Immunol. 319:131-56.
62. Stipp RN (2010) Caracterização dos regulons de CovR e VicRK em *Streptococcus mutans*. UNICAMP/FOP.
63. Stipp RN, Boisvert H, Smith DJ, Höfling JF, Duncan MJ, Mattos-Graner RO. (2013) CovR and VicRK regulate cell surface biogenesis genes required for biofilm formation in *Streptococcus mutans*.; PLoS One. 8(3):e58271.
64. Treviño J, Perez N, Ramirez-Peña E, Liu Z, Shelburne SA, Musser JM, and Sumbly P (2009) CovS simultaneously activates and inhibits the CovR-mediated repression of distinct subsets of group A *Streptococcus* virulence factor-encoding genes. Infect. Immun. 77, 3141–3149
65. Xu P, Alves JM, Kitten T, Brown A, Chen Z , Ozaki LS, Manque P, Ge X, Serrano MG, Puiu D, Hendricks S, Wang Y, Chaplin MD, Akan D, Paik S, Peterson DL, Macrina FL, Buck GA, (2007) Genome of the Opportunistic Pathogen *Streptococcus sanguinis*, Journal Of Bacteriology, 189 (8): 3166–3175.
66. Yuste J, Sen A, Truedsson L, Jönsson G, Tay LS, Hyams C, et al. (2008) Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. Infect Immun.; 76(8):3761-70.



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



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Estudo da participação dos reguladores de transcrição gênica VicRK e CovR na susceptibilidade de Streptococcus mutans à opsonização pelo sistema complemento"**, protocolo nº 031/2012, dos pesquisadores Renata de Oliveira Mattos Graner, Flávia Sammartino Mariano Rodrigues e Livia Araújo Alves, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 18/06/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Analysis of the roles of the transcriptional regulators VicRK and CovR in the susceptibility of Streptococcus mutans to opsonization by the complement system"**, register number 031/2012, of Renata de Oliveira Mattos Graner, Flávia Sammartino Mariano Rodrigues and Livia Araújo Alves, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 06/18/2012.

Livia M A Tenuta
Profa. Dra. Livia Maria Andalo Tenuta
 Secretária
 CEP/FOP/UNICAMP

[Signature]
Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

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

ANEXO 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA - FOP/UNICAMP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título: Estudo da participação dos reguladores de transcrição gênica VicRK e CovR na susceptibilidade de *Streptococcus sanguinis* à opsonização pelo sistema complemento

Pesquisadores: Renata de Oliveira Mattos Graner (Pesquisadora responsável); Thaís Rossini de Oliveira; Flávia Sammartino Mariano Rodrigues

Este termo contém as informações sobre a pesquisa na qual você está sendo convidado a participar. Por favor, leia-o atentamente. Qualquer dúvida que tiver, esclareça-a com a pesquisadora responsável (Renata de Oliveira Mattos Graner), a qual estará a sua inteira disposição. Você deve decidir se deseja ou não participar desta pesquisa após entender todos os aspectos descritos a seguir, de modo que possa tomar uma decisão consciente.

1) Objetivo: estudar os mecanismos através dos quais as bactérias da espécie *Streptococcus sanguinis* adquirem características que as tornam capazes de escapar do sistema complemento, componente importante do sistema imune, na defesa contra bactéria, e causar a endocardite bacteriana em humanos. Assim, neste estudo será investigado o comportamento destas bactérias quando em contato com o sangue humano de pessoas saudáveis.

2) Descrição da pesquisa: Participação deste trabalho voluntários adultos, saudáveis, com idade entre 20 e 40 anos. A coleta de 10 ml de sangue do voluntário será realizada assepticamente, através da punção da veia braquial após assepsia da pele com algodão estéril embebido em álcool 70%. O sangue será coletado em tubos estéreis heparinizados pelo método a vácuo, não necessitando que indivíduo esteja em jejum. As amostras serão processadas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOPUNICAMP, por profissionais experientes onde serão expostas a presença de bactérias e assim serão avaliados o crescimento e sobrevivência desta em sangue.

3) Desconfortos, riscos e benefícios esperados: Os riscos previsíveis a coleta de sangue são mínimos, mas o voluntário poderá apresentar sintomas ou desconforto tais como: tontura, queda de pressão, desmaio e náuseas, mas estes serão minimizados uma vez que todos os procedimentos de biossegurança serão aplicados. As coletas de sangue serão realizadas no Ambulatório Médico da FOP-UNICAMP; portanto nos casos de ocorrência dos sintomas mencionados, o paciente será colocado confortavelmente na posição de decúbito lateral do lado esquerdo e assistido pelo pesquisador e/ou profissional de enfermagem se necessário. Os riscos de ocorrência destes sintomas são mínimos, pois os procedimentos de coleta de sangue serão realizados por profissional com experiência e formação especializada para esta função (biomédica: Flávia Sammartino Mariano Rodrigues do CRBM: 9585). Além disso, voluntários que relataram ansiedade frente aos procedimentos de coleta de sangue serão excluídos do estudo. Também há riscos previsíveis para os pesquisadores, sendo assim a coleta de sangue será realizada pelo método a vácuo, o qual é um sistema fechado de coleta, onde o sangue flui diretamente para o tubo, proporcionando ao profissional biossegurança, pois não há necessidade do manuseio da amostra de sangue. Também não haverá benefício direto aos voluntários, mas esses poderão ter acesso aos dados da pesquisa relacionado a sua participação.

4) Alternativas: Não existem métodos alternativos para a obtenção das informações necessárias.

5) Exclusões: Serão excluídos da pesquisa, adultos com problemas de saúde geral ou sob antibioticoterapia até duas semanas antes do dia da coleta de sangue. Pessoas que relataram apresentar ansiedade frente aos procedimentos de coleta de sangue serão excluídas.

6) Compensação: Não há previsão de indenização ou ressarcimento, pois não existirão riscos ou gastos relacionados exclusivamente com a participação na pesquisa.

7) Confidencialidade dos registros: Você terá direito à privacidade, visto que todas as informações obtidas laboratoriais permanecerão confidenciais nos âmbitos possíveis da lei, assegurando a proteção da sua imagem. Serão respeitados seus valores culturais, sociais, morais, religiosos e éticos. A menos que a revelação seja exigida por ação legal ou regulatória, todos os esforços serão feitos para protegê-lo, de serem identificados pessoalmente. Como participante desta pesquisa, você terá acesso aos resultados obtidos e permitirá o acesso dos mesmos aos pesquisadores envolvidos e aos membros da comissão de ética responsável. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas científicas, porém sua identidade não será divulgada.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Pág 1



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

8) Direito de participar, recusar ou sair: Sua participação é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou mesmo interromper sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perdas de seus benefícios aos quais de outra forma tenha direito ou sem ter prejuízo ao seu cuidado. Ao participar, você concorda em cooperar com a pesquisa, não abrindo mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado.

9) Contatos: Quaisquer dúvidas poderão ser esclarecidas com a pesquisadora responsável, Renata de Oliveira Mattos Graner (19) 21065379, e-mail: rmgraner@fop.unicamp.br, com a aluna de mestrado Thaís Rossini de Oliveira (19) 9888-1847. e-mail: oliver-tr@hotmail.com e com a pesquisadora colaboradora Flávia Sammartino Mariano Rodrigues (19) 2106-

5379, e-mail: flaviasmariano@yahoo.com.br; Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP, Avenida Limeira, 901, Bairro: Areião.

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. "Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP: Av Limeira 901, FOP-Unicamp, CEP 13414 -903, Piracicaba – SP. Fone/Fax 19-21065349, e-mail cep@fop.unicamp.br e webpage www.fop.unicamp.br/cep".

CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Tendo compreendido o termo de informação e consentimento para a participação da pesquisa clínica intitulada "Estudo da participação dos reguladores de transcrição gênica VicRK e CovR na susceptibilidade de *Streptococcus mutans* à opsonização pelo sistema complemento".

Eu, _____, concordo em participar deste estudo. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidades. Autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores envolvidos para a publicação em revistas científicas e apresentação em congressos, desde que minha identidade não seja divulgada.

Recebi uma cópia do termo de consentimento.

(Não assine este termo caso não tenha tido oportunidade de esclarecer suas dúvidas ou não tenha recebido respostas satisfatórias a todas elas).

Piracicaba, _____ de _____ de _____

Assinatura. RG:

Renata de Oliveira Mattos Graner
Pesquisadora responsável
RG: 19628648-8

Thaís Rossini de Oliveira
Pesquisadora Colaboradora
RG: 45.993.278-0

Flávia Sammartino Mariano Rodrigues
Co-orientadora
RG: 33949014-7