



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

LEONARDO LIBARDI PAGOTTO

**INIBIÇÃO DA COMPETÊNCIA DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*
PELO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA**

PIRACICABA

2019

LEONARDO LIBARDI PAGOTTO

**INIBIÇÃO DA COMPETÊNCIA DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*
PELO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para obtenção do título de
Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO
PELO ALUNO LEONARDO LIBARDI PAGOTTO E
ORIENTADO PELO PROF. DR. ANTÔNIO PEDRO RICOMINI
FILHO.

PIRACICABA

2019

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

P149i Pagotto, Leonardo Libardi, 1996-
Inibição da competência de *Streptococcus mutans* pelo digluconato de clorexidina / Leonardo Libardi Pagotto. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Antônio Pedro Ricomini Filho.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Clorexidina. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Competência de transformação por DNA. 4. Transformação genética. I. Ricomini Filho, Antônio Pedro, 1983-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Título em outro idioma: Inhibition of *Streptococcus mutans* competence by chlorhexidine digluconate

Palavras-chave em inglês:

Chlorhexidine

Streptococcus mutans

DNA transformation competence

Transformation, genetic

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 01-10-2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, por ter acreditado e investido em mim durante todos esses anos.

Aos meus amigos pelos momentos de alegria, risadas, bebedeiras e também pelos momentos de choro e desespero.

Aos professores incríveis que formaram meu caráter, em especial àqueles que me orientaram durante a realização deste trabalho

A todos que de alguma forma fizeram parte da minha jornada.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do International Partnership for Outstanding Education, Research, and Innovation (INTPART), processo nº 274867.

Agradeço ao Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho, pela orientação dada.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pelo apoio.

À Prof^a. Dr^a. Fernanda Cristina Petersen e toda a equipe do Instituto de Biologia Oral da Universidade de Oslo, por terem possibilitado a realização deste trabalho.

RESUMO

Competência natural é um estado que permite que *Streptococcus mutans* se transforme geneticamente captando DNA do ambiente e incorporando-o em seu genoma. O maquinário requerido depende da expressão do fator sigma *sigX*, que pode ser induzido por peptídeo estimulador de competência (CSP) ou pelo peptídeo indutor de *sigX* (XIP). O digluconato de clorexidina (CHX) é comumente usado como enxaguatório bucal e poderia interferir na expressão de *sigX* de *S. mutans*, tornando as bactérias mais, ou menos capazes de incorporar DNA do meio ambiente, contribuindo assim para a transferência horizontal de genes e aquisição de resistência bacteriana. Sendo assim, o objetivo deste foi avaliar o efeito do digluconato de clorexidina (CHX) na ativação de competência e transformação genética de *S. mutans*. Foram utilizados mutantes isogênicos de *S. mutans* contendo repórter de luciferase no promotor dos genes *cipB* (ativação por CSP), *sigX* e *comS* (ativação por XIP), com ou sem deleção dos genes *comS* e *comC*. Culturas foram preparadas e congeladas em densidade óptica (OD600) de 0,5. As culturas foram diluídas (1:10) e distribuídas em placas de 96 poços, seguidas da adição de 1 mM de D-luciferina, 250 nM de CSP ou 1 µM de XIP, e concentrações crescentes de CHX de 0, 0,25, 0,50 ou 1,0 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 12 h em um leitor de microplacas, durante o qual o crescimento (OD600) e a expressão de *cipB* ou *sigX* (luminescência) foram mensurados a cada 30 min. Os dados de luminescência foram normalizados pelos valores de OD600 e a área sob a curva (AUC) calculada. O teste de transformação bacteriana foi realizado usando o amplicon de resistência à canamicina (aRJ02) que foi adicionado após 150, 270 ou 390 min de crescimento. Após incubação por 1 h, as suspensões foram plaqueadas em meio ágar não seletivo (TSB) e seletivo (TSB + canamicina a 500 µg/mL). Os dados foram analisados por One-way ANOVA e Teste de Tukey ($\alpha=5\%$). A clorexidina foi capaz de reduzir a expressão de *cipB*, *sigX* e *comS* em todas as concentrações testadas e isso se refletiu também na diminuição da eficiência de transformação em todos os tempos analisados. Sob as condições testadas, é possível concluir que o digluconato de clorexidina quando utilizado em concentrações sub-inibitórias diminui a capacidade de *S. mutans* de captar DNA exógeno e de incorporá-lo em seu genoma.

Palavras-chave: Clorexidina. *Streptococcus mutans*. Competência de transformação por DNA. Transformação genética.

ABSTRACT

Natural competence is a state that allows *Streptococcus mutans* to genetically transform by capturing DNA from the environment and incorporating it into its genome. The required machinery depends on the expression of the *sigX* factor sigma, which can be induced by the competence stimulating peptide (CSP) or the *sigX* inducing peptide (XIP). Chlorhexidine digluconate (CHX) is commonly used as a mouthwash and could interfere with *S. mutans sigX* expression, making bacteria more or less able to incorporate DNA from the environment, thus contributing to horizontal gene transfer and acquisition. of bacterial resistance. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of chlorhexidine digluconate (CHX) on competence activation and genetic transformation of *S. mutans*. *S. mutans* isogenic mutants containing luciferase reporter were used in the *cipB* (CSP activation), *sigX* and *comS* (XIP activation) gene promoter, with or without deletion of the *comS* and *comC* genes. Cultures were prepared and frozen at optical density (OD600) of 0.5. The cultures were diluted (1:10) and distributed into 96-well plates, followed by the addition of 1 mM D-luciferin, 250 nM CSP or 1 μ M XIP, and increasing CHX concentrations of 0, 0.25, 0.50 or 1.0 μ g/mL. The plates were incubated at 37 ° C for 12 h in a microplate reader, during which growth (OD600) and *cipB* or *sigX* (luminescence) expression were measured every 30 min. Luminescence data were normalized by OD600 values and area under the curve (AUC) calculated. The bacterial transformation test was performed using kanamycin resistance amplicon (aRJ02) which was added after 150, 270 or 390 min of growth. After incubation for 1 h, the suspensions were plated on non-selective (TSB) and selective (TSB + kanamycin at 500 μ g/mL) agar medium. Data were analyzed by One-way ANOVA and Tukey Test (α = 5%). Chlorhexidine was able to reduce *cipB*, *sigX* and *comS* expression at all concentrations tested and this was also reflected in the decrease of transformation efficiency in all analyzed times. Under the conditions tested, it can be concluded that chlorhexidine digluconate when used at sub-inhibitory concentrations decreases *S. mutans* ability to capture exogenous DNA and incorporate it into its genome.

Key words: Chlorhexidine. *Streptococcus mutans*. DNA transformation competence. Bacterial transformation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
3 PROPOSIÇÃO	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Microrganismos e meios de cultura	15
4.2 Plasmídeo	16
4.3 Peptídeos sintéticos	17
4.4 Análise da expressão gênica aparelho leitor de microplacas multidetecção	17
4.5 Análise da transformação bacteriana	18
4.6 Análise estatística	18
5 RESULTADOS	19
5.1 Expressão gênica e eficiência de transformação bacteriana em TSB + CSP	19
5.2 Expressão gênica em CDM + XIP	22
6 DISCUSSÃO	24
7 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO	30

1 INTRODUÇÃO

Antibióticos têm sido um dos pilares da medicina moderna no controle de infecções. No entanto, sua eficácia está sendo ameaçada pelo aparecimento de bactérias resistentes a eles (Aminov, 2009). Dentre os mecanismos de transferência genética horizontal, os quais podem proporcionar às bactérias resistência a antibióticos, a transformação é o único em que a célula receptora tem controle sobre o processo da transferência (Junges, 2019). A transformação genética é amplamente distribuída em bactérias presentes na cavidade oral, incluindo estreptococos, e ocorre durante um estado diferenciado geneticamente programado chamado de competência. Durante a competência, as bactérias tornam-se capazes de captar DNA do ambiente e incorporá-lo a seus genomas, o que confere a transformação genética (Johnsborg et al., 2007; Johnston, 2014).

Dentre as bactérias presentes na cavidade oral capazes de sofrer transformação genética naturalmente, *Streptococcus mutans* (Marsh et al., 2011) possui conhecido mecanismo de ativação da competência bacteriana, o qual é conservado entre as diferentes cepas de *S. mutans* (Ricomini Filho et al., 2019). O maquinário requerido para ativar o estado de competência depende da expressão do fator sigma *sigX*, o qual pode ser induzido por peptídeo estimulador de competência (*competence stimulating peptide* - CSP) ou pelo peptídeo indutor de *sigX* (*sigX-inducing peptide* - XIP) (Håvarstein et al., 1997; Mashburn-Warren et al., 2010; Khan et al., 2012).

O mecanismo de ação de CSP é baseado na ligação do peptídeo e autofosforilação à proteína receptora de superfície ComD, que então transfere a fosforilação para a proteína reguladora ComE. ComE estimula os chamados genes de competência primários: *comC* (que codifica o pré-CSP) e *comAB* (que codifica proteínas de transporte para a exportação do pré-CSP). Por razões desconhecidas, ComE consegue ativar a expressão do gene *sigX*, regulador-mestre da competência. O fator *SigX* é responsável por ativar os genes tardios da competência, operons que serão responsáveis por capturar, recombinar e incorporar o DNA exógeno no DNA bacteriano (Håvarstein et al., 1997; Petersen et al., 2006; Petersen e Scheie, 2010).

Diferentemente do CSP, o peptídeo indutor de *sigX* (XIP) é capaz de ativar a competência bacteriana de maneira direta, sendo considerado hoje o principal peptídeo ativador de competência em *S. mutans*. XIP é importado por uma proteína de membrana e se liga a uma proteína intracelular, ComR. Esse complexo XIP-ComR além de se ligar a região promotora do *sigX*, ativando-o diretamente, também é capaz de ativar genes primários: *comS*

(que codifica o pré-XIP) e *comR* (que codifica a proteína intracelular), gerando um feedback positivo (Mashburn-Warren et al., 2010; Khan et al., 2012; Fontaine et al., 2013).

Estes sistemas de ativação de competência, via CSP e XIP, poderiam ser modulados frente ao estresse sofrido pelas bactérias orais quando expostas a antimicrobianos, a exemplo do digluconato de clorexidina (CHX), o que poderia contribuir para a aquisição de material genético proveniente de células mortas. CHX é um antimicrobiano de amplo espectro usado na odontologia na forma de enxaguatórios, géis e vernizes (Jones, 1997; Van der Weijden et al., 2015). É amplamente utilizado como enxaguatório para controle químico do biofilme em pacientes periodontais. Seu mecanismo de ação consiste na ligação com os fosfolipídios da membrana bacteriana, causando uma perda de líquido intracelular e consequente morte por lise da membrana. Dependendo da concentração, a clorexidina pode ser bacteriostática ou bactericida (Jones, 1997; Van der Weijden et al., 2015).

Apesar de ser amplamente utilizado, o efeito de CHX sobre a ativação da competência e transformação bacteriana em *S. mutans* ainda é desconhecida. CHX em concentração bacteriostática, poderia modular competência e transformação bacteriana em *S. mutans*, favorecendo que as células adquiram material genético proveniente de outras células mortas, incluindo genes que possam prover resistência a antibióticos, os quais podem ser ministrados concomitantemente no tratamento de doenças periodontais. Sendo assim, o objetivo deste estudo será avaliar o efeito do digluconato de clorexidina (CHX) na ativação de competência e transformação genética de *S. mutans*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Durante as últimas décadas, muito têm se discutido sobre a eficácia de antibióticos, devido ao aparecimento cada vez mais frequente de microrganismos resistentes a eles, discussão que envolve uma grande variedade de antibióticos já conhecidos como: Amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, novobiocina, tetraciclina e streptomina, dentre outros (Sturød, 2019). No entanto, tal discussão pouco tem se estendido para os antimicrobianos de uso tópico, dentre eles o digluconato de clorexidina (CHX), que é amplamente utilizada na odontologia nas mais diversas formas como bochechos, géis e vernizes.

O estudo de Wand et. al. (2016) analisou os efeitos fenotípicos da adaptação ao digluconato de clorexidina, em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, com foco em resistência cruzada à antibióticos. Para isso, utilizou seis cepas isoladas clínicas e em cinco delas a exposição constante a concentrações sub-inibitórias de clorexidina levou as bactérias a adquirir resistência à colistina, um antibiótico utilizado como último recurso em infecções com microrganismos super-resistentes. Foi observado que houve mutações em diversos genes, como *phoPQ*, *pmrD*, *prmK*, *smvR* e *smvA*. Interessantemente, o contrário não aconteceu, pois cepas expostas à colistina não apresentaram resistência aumentada a clorexidina. O estudo levanta a importância do surgimento de cepas resistentes à colistina, pois é um antibiótico utilizado como último recurso, e a exposição a clorexidina é constante em meio hospitalar, pois a mesma também é amplamente utilizada como antisséptico para antisepsia de superfícies e também de pele e mucosa.

Diferente do presente estudo, que utiliza *Streptococcus mutans*, tal estudo utilizou *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria que é amplamente conhecida por apresentar cepas resistentes a vários antibióticos, e que possui um mecanismo relacionado à aquisição de resistência completamente diferente do *S. mutans*; e as condições e variáveis também são diferentes. O estudo foca na resistência adquirida por meio da aplicação de clorexidina como método antisséptico em superfícies, e o presente estudo pretende avaliar qual seria o efeito na cavidade oral.

A revisão sistemática e meta-análise de Kampf et. al. (2016) observou diversos estudos com o objetivo de encontrar microrganismos com resistência adquirida a clorexidina e concluiu que bactérias dos gêneros *Pseudomonas spp.*, *Providencia spp.*, *Enterococcus spp.* e *Klebsiella spp.* já possuem isolados clínicos resistentes, e que genes a resistência cruzada à antibióticos (quando a exposição a clorexidina causa resistência a um outro tipo de antibiótico) ainda é relativa, mas que existem indícios fortes, principalmente em bactérias do

gênero *Klebsiella spp.* O estudo também cita que genes relacionados a resistência a clorexidina foram encontrados no Brasil em 80% dos isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), uma cepa amplamente conhecida em infecções hospitalares resistentes à antibióticos. O estudo sugere que seja realizado uma melhor indicação do uso de clorexidina, apenas em casos que o benefício é claro para o paciente, e que não seja feito o uso discriminado.

No entanto, todos os estudos utilizados na revisão não citam isolados clínicos do gênero *Streptococcus*, que possuem um mecanismo de ativação da competência e completamente diferente dos gêneros citados e foram utilizados no presente estudo. Além de tudo, os estudos utilizaram isolados clínicos em ambiente hospitalar e não de pacientes submetidos à tratamento odontológico.

Já a recente revisão de Cieplik et. al. (2019) levantou o questionamento se existe motivo para preocupação em relação ao surgimento de microrganismos da microbiota oral adquirirem resistência à clorexidina, uma vez que a resistência a ela tem sido relatada na literatura, incluindo a resistência cruzada à colistina (Wand et. al., 2016). Segundo o autor, diferentes estudos relataram o surgimento de bactérias Gram positivas, a exemplo das do gênero *Staphylococci spp.* resistentes a clorexidina que possuíam bombas de efluxo multidrogas, capazes de se ligar a composto catiônicos e bombeá-los para fora do citoplasma. Em bactérias gram negativas como o *Pseudomonas stutzeri*, mudanças na membrana de lipopolissacarídeos, que neutralizariam as moléculas de clorexidina, têm sido relacionadas com a aquisição de resistência a esse antimicrobiano. O autor também comenta que pouco se sabe qual o efeito que a clorexidina poderia provocar em biofilmes orais já maduros, mas que partes mais internas do biofilme são expostas a concentrações sub inibitórias e o estresse causado pela presença do antimicrobiano poderia levar ao surgimento de microrganismos resistentes.

O estudo in vitro de Sturød e colaboradores (2018) avaliou o efeito de diferentes tipos de antibióticos na expressão do *sigX* e o consequente efeito de concentrações sub inibitórias na eficiência de transformação bacteriana em *Streptococcus pneumoniae*, *mitis* e *mutans*. O estudo observou que a ciprofloxacina, novobiocina e eritromicina aumentaram a expressão do *sigX* e também a capacidade de transformação bacteriana. Já quando as bactérias foram expostas à tetraciclina, também houve aumento na expressão do *sigX*, mas isso não refletiu na transformabilidade, que teve sua eficiência diminuída. A ampicilina e a estreptomicina, por sua vez, diminuíram tanto a expressão de *sigX* quanto a transformabilidade das bactérias que foram expostas a concentrações sub inibitórias desses antibióticos.

Apesar desse estudo ter utilizado as mesmas variáveis-resposta do presente estudo, a principal espécie bacteriana utilizada foi o *Streptococcus pneumoniae*, que possui um mecanismo de competência altamente conhecido, porém ligeiramente diferente do *S. mutans* utilizado no atual estudo. Além disso, nenhum antibiótico utilizado possui o mesmo mecanismo de ação da clorexidina.

Em suma, não é possível encontrar na literatura nenhum estudo que tenha avaliado o efeito da clorexidina na ativação de genes relacionados à competência e muito menos na transformação bacteriana, variáveis importantíssimas e que possuem alta correlação com a aquisição de genes de resistência antimicrobiana.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito do digluconato de clorexidina (CHX) em concentrações bacteriostática a bactericida na ativação de competência bacteriana e transformação genética de *Streptococcus mutans*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o efeito de diferentes concentrações de CHX (bacteriostática à bactericida), este estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira foi avaliada a expressão de genes relacionados à ativação de competência bacteriana por meio de repórteres de luciferase acoplados aos promotores de genes alvos e na segunda etapa foi avaliada a transformação genética de células, células que foram capazes de internalizar material genético do meio externo e incorporá-lo ao seu genoma. O projeto foi realizado em colaboração internacional com o Institute of Oral Biology - University of Oslo (UiO) durante estágio sob supervisão da professora Fernanda C. Petersen.

4.1 Microrganismos e meios de cultura

Os microrganismos (cepa de *Streptococcus mutans* e mutantes isogênicos) e plasmídeo que foram utilizados neste estudo estão apresentados na Tabela 1. Culturas dos microrganismos foram cultivadas em à 37 °C, 5% de CO₂ em caldo Tryptone-Soy Broth (TSB) ou CDM (chemically defined médium - meio quimicamente definido) (Mashburn-Warren et al., 2010; Khan et al., 2012; Desai et al., 2012) e armazenadas à -80 °C em meio contendo 15% de glicerol. Quando necessário, os meios de cultura foram suplementados com eritromicina, canamicina e espectinomicina em concentração final de 20 µg/mL, 500 µg/mL, e 200 µg/mL, respectivamente.

Tabela 1 - Microrganismos e plasmídeos que foram utilizados no estudo

Microrganismos/plasmídeos	Características relevantes
Cepa de <i>Streptococcus mutans</i> / Descrição	
<i>Streptococcus mutans</i> UA159	cepa selvagem
SM045 / <i>Streptococcus mutans</i> Δ dexA, Kan ^R	cepa mutante, não possui o gene <i>dexA</i> , resistente a canamicina (Morrison et al., 2015)
SM059 / <i>Streptococcus mutans</i> Φ (P <i>cip</i> Bluc), Spc ^R	cepa mutante, inserção de gene de luciferase ligado no promoter do gene <i>cipB</i> (Khan et al., 2012)
SM068 / <i>Streptococcus mutans</i> Φ (P <i>sigX</i> luc), Spc ^R	cepa mutante, inserção de gene de luciferase ligado no promoter do gene <i>sigX</i> (Khan et al., 2012)
SM074 / <i>Streptococcus mutans</i> Δ comC:: <i>kan</i> Φ (P <i>sigX</i> luc), Kan ^R Spc ^R	cepa mutante, não produz CSP (Δ comC), inserção de gene de luciferase ligado no promoter do gene <i>sigX</i> (Khan et al., 2012)
SM091 / <i>Streptococcus mutans</i> Δ comS:: <i>erm</i> Φ (P <i>sigX</i> luc), Erm ^R Spc ^R	cepa mutante, não produz XIP (Δ comS), inserção de gene de luciferase ligado no promoter do gene <i>sigX</i> (Khan et al., 2012)
SM112 / <i>Streptococcus mutans</i> Φ (P <i>comS</i> luc), Spc ^R	cepa mutante, inserção de gene de luciferase ligado no promoter do gene <i>comS</i> (Khan et al., 2017)
Plasmídeos	
aRJ02	Kan ^R ; plasmídeo replicativo em estreptococos com cassete de resistência à canamicina

Δ - deleção de gene

:: - acoplamento de cassete de resistência ao gene deletado

Φ - inserção de gene

^R - cepa resistente a determinado antibiótico

Antibióticos - Kan: canamicina; Spc: Espectinomicina, Erm: Eritromicina

4.2 Plasmídeo

A cepa mutante com deleção do gene *dexA* e resistente à canamicina foi unicamente utilizada para a produção do amplicon aRJ02 (Tabela 1). DNA bacteriano da cepa *Streptococcus mutans* Δ dexA, Kan^R e os primers FP906 (ATTCACCCCAAAAAGTGCTG) e FP907 (ATAATATGCGGACGCTGAGG) foram utilizados para produzir o amplicon aRJ02 (6kb, Kan^R) (Morrison et al., 2015). O DNA bacteriano foi amplificado via PCR usando a enzima Q5 DNA polimerase (New England Biolabs) seguindo as instruções do fabricante. A temperatura e tempos corretos foram calculadas por meio do software NEB Tm Calculator,

disponibilizado pelo fabricante da enzima. A concentração final do amplicon foi determinada por meio de eletroforese em gel (Sturød et al., 2018).

4.3 Peptídeos sintéticos

Peptídeos referentes à sequência funcional de CSP (ComC) e XIP (ComS) serão utilizados nos procedimentos de transformação bacteriana para a criação dos mutantes, e também, para verificar a resposta dessas moléculas sinalizadoras quando no estudo com os mutantes em que $\Delta comC$ e $\Delta comS$. As sequências de CSP (18aa) SGSLSSTFFRLFNRSFTQA (Petersen et al., 2006; Petersen and Scheie, 2010) e XIP (7aa) GLDWWSL (Mashburn-Warren et al., 2010; Khan et al., 2012; Ricomini Filho et al., 2019) foram obtidas com alto grau de pureza através de verificação por meio de HPLC. Os peptídeos foram diluídos em água e as soluções de estoque armazenadas a -20°C .

4.4 Análise da expressão gênica aparelho leitor de microplacas multidetecção

Os mutantes com repórter de luciferase (Merritt et al., 2005; Khan et al., 2012; Ricomini Filho et al., 2019) foram utilizados para avaliar ativação de competência bacteriana. A cepa mutante isogênica com repórter de luciferase acoplado ao gene *cipB* (*SMU.1914*) evidenciou sua ativação por meio de CSP (*S. mutans* $\Phi(P_{cip}Bluc)$), enquanto as cepas mutantes isogênicas com repórter de luciferase acoplado ao gene *sigX* evidenciam suas ativações por meio de XIP (*S. mutans* $\Phi(P_{sigX}luc)$) e também CSP. Foram utilizadas também cepas com repórteres de luciferase em mutantes isogênicos com deleção dos genes *comC* e *comS*, os quais só podem ser ativados com peptídeos exógenos CSP e XIP, respectivamente. Por meio de um equipamento leitor de microplaca de multidetecção que mensura luminescência, foi possível verificar a ativação dos sistemas por meio da expressão dos genes alvo. Dessa maneira, foi possível monitorar em tempo real a ativação da competência por meio da expressão genética (Merritt et al., 2005; Khan et al., 2012; Ricomini Filho et al., 2019), bem como compreender como CHX pode modular a competência bacteriana.

Alíquotas das pré-culturas de todas as cepas foram descongeladas, centrifugadas e ressuspendidas em meio TSB ou CDM. A suspensão foi distribuída em placas de 96 poços pretas com o fundo transparente e em cada poço foi adicionado D-Luciferina na concentração final de 0,1 mM e digluconato de clorexidina em concentrações finais de 0, 0,25, 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Nos poços onde o meio de cultura é o TSB, foi adicionado o CSP-18aa na concentração final de 250 nM e nos poços onde o meio é CDM, foi adicionado XIP na concentração de 1 μM . As

placas foram levadas a um leitor de microplacas multidetecção, encubados a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. Leituras referentes à densidade ótica OD600 (crescimento bacteriano) e luminescência (expressão dos genes em estudo) foram realizadas a cada 30 minutos durante 12 horas. Os dados de luminescência (referente a expressão dos genes) foram normalizados pela OD600 (crescimento bacteriano), e com os valores obtidos ao longo do tempo foram determinados os valores de área sob a curva (AUC).

4.5 Análise da transformação bacteriana

Alíquotas das pré-culturas foram descongeladas, centrifugadas e ressuspensas em meio TSB ou CDM. O mesmo processo citado acima foi repetido, sendo que nos tempos de 150, 270 e 390 min foram adicionados em cada poço 3 µL do amplicon aRJ02. A placa foi novamente encubada durante 1 h sob as mesmas condições e o conteúdo dos poços foi plaqueado em diferentes placas de ágar: não-seletivas (TSB) e seletivas (TSB suplementado com canamicina na concentração de 50 µg/mL). As placas de ágar foram encubadas a 37°C, 5% CO₂ durante 48h e foi feita a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) das mesmas. Para o cálculo da eficiência da transformação em porcentagem, a contagem de UFC das placas seletivas foi dividida pela contagem de UFC das placas não seletivas e multiplicado por 100.

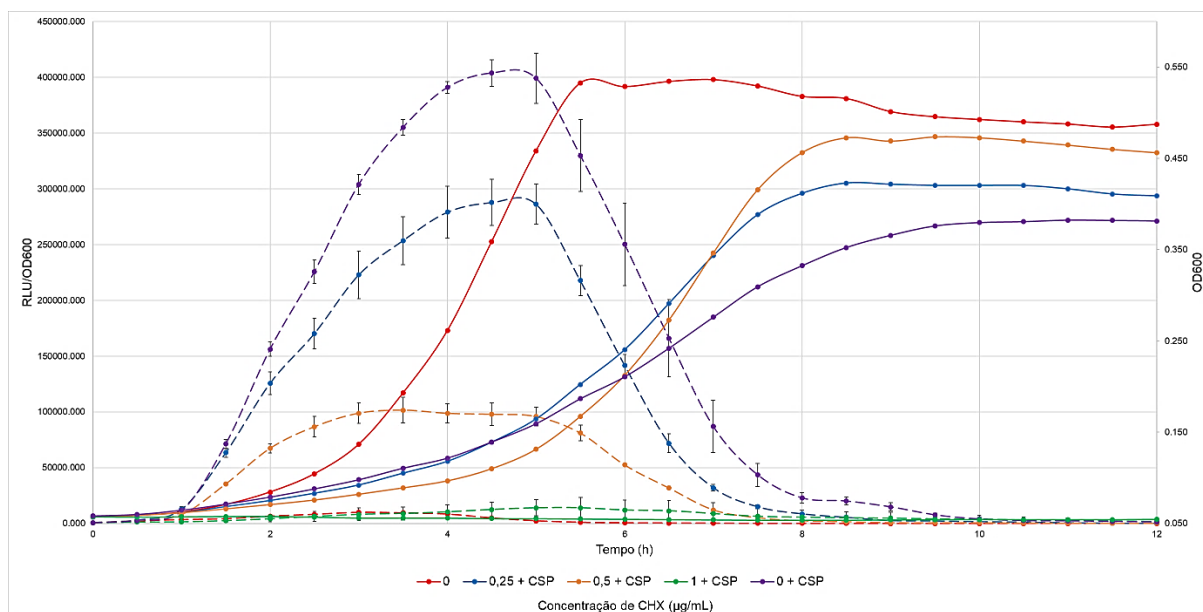
4.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SAS (SAS Institute Inc., versão 8.01) empregando um nível de significância fixado em 5%. Suposições de homogeneidade de variâncias e distribuição normal de erros foram verificadas para todas as variáveis de resposta testadas. Os dados de luminescência (referente a expressão dos genes) foram normalizados pela OD600 (crescimento bacteriano), e com os valores obtidos ao longo do tempo foram determinados os valores de área sob a curva (AUC). Os dados de transformação bacteriana foram expressos em eficiência (porcentagem de células transformadas em relação à população de células). Tanto os dados de área sob a curva referente a expressão genética, quando de transformação bacteriana foram avaliados por ANOVA um e dois critérios, seguido do Teste de Tukey, tendo como fator as diferentes concentrações de CHX.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão gênica e eficiência de transformação bacteriana em TSB + CSP

Os resultados a seguir são referentes a cepa SM068 [*Streptococcus mutans* $\Phi(PsigXluc)$], cepa que possui repórter de luciferase acoplado ao gene *sigX* e possui produção interna de CSP e XIP.



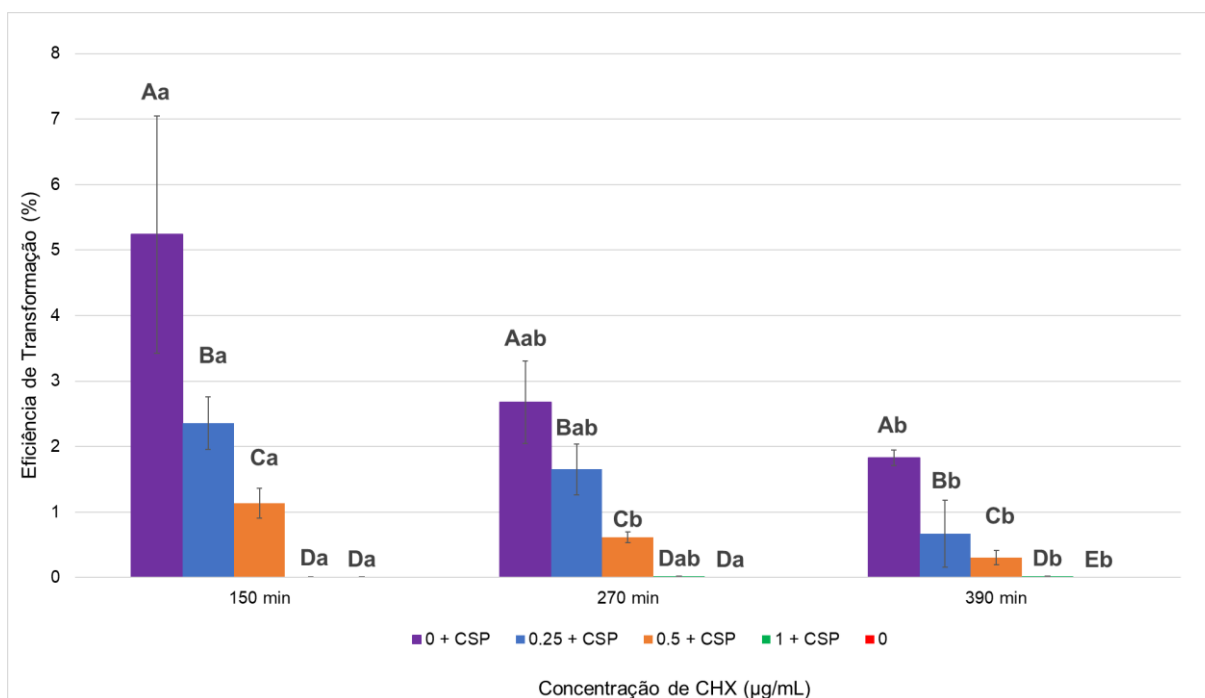
Expressão do *sigX* (RLU/OD₆₀₀) (curva hachuradas) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) (curvas inteiras) da cepa SM068 em diferentes concentrações de CHX durante 12 h (média $\pm$ DP, n=3).

Gráfico 1 - Expressão do gene *sigX* normalizada pela densidade óptica da cultura de microrganismos (RLU/OD₆₀₀) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) em diferentes concentrações de CHX ao longo do tempo em meio TSB.

Tabela 1 - Área sob a curva (AUC) da expressão do *sigX* normalizada pela OD nas diferentes concentrações de CHX.

Tratamento	AUC
0 µg/ml CHX + CSP	$3,3 \times 10^6 \pm 2 \times 10^3$ ^A
0,25 µg/mL CHX + CSP	$2,2 \times 10^6 \pm 1 \times 10^3$ ^B
0,5 µg/mL CHX + CSP	$8,8 \times 10^5 \pm 3 \times 10^2$ ^C
1,0 µg/mL CHX + CSP	$1,5 \times 10^5 \pm 1 \times 10^2$ ^D
0 µg/mL CHX	$6,4 \times 10^4 \pm 5 \times 10^2$ ^E

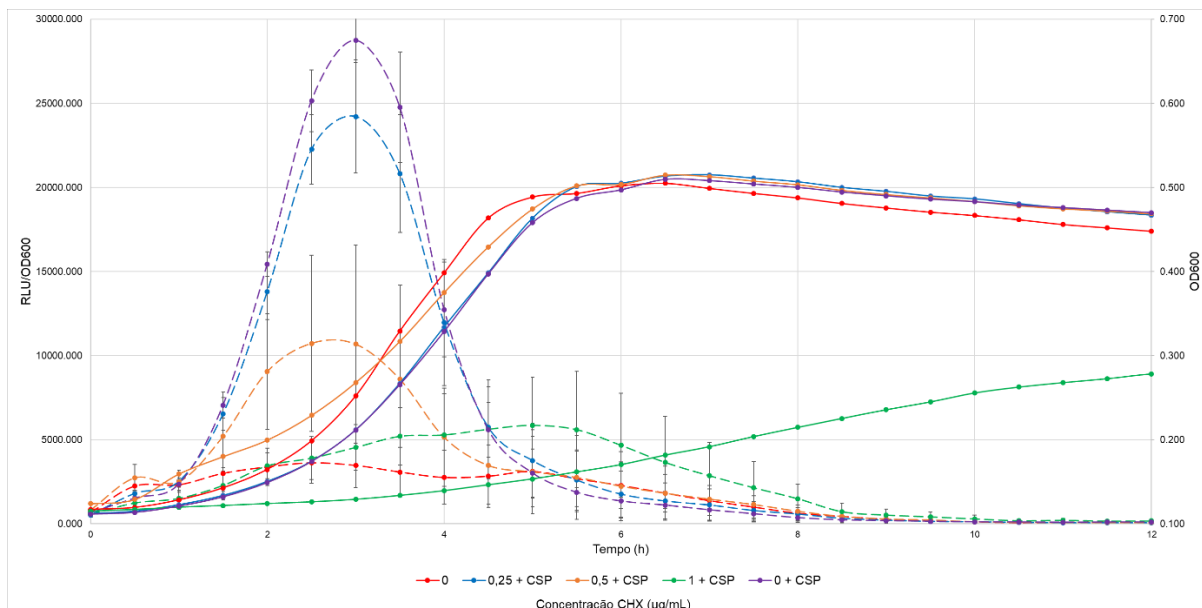
Área sob a curva (AUC) e eficiência de transformação (%) da cepa SM068 em TSB. One-way ANOVA, teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). Letras maiúsculas diferentes representam diferença significativa. (média $\pm$ DP, n=3)



Eficiência de transformação (%) da cepa SM068 em diferentes concentrações de CHX nos tempos de 150, 270 e 390 min (média $\pm$ DP, n=3). Foi utilizado Two-way ANOVA teste de Tukey ($\alpha = 5\%$). Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes. Letras maiúsculas representam tratamentos e letras minúsculas representam grupos.

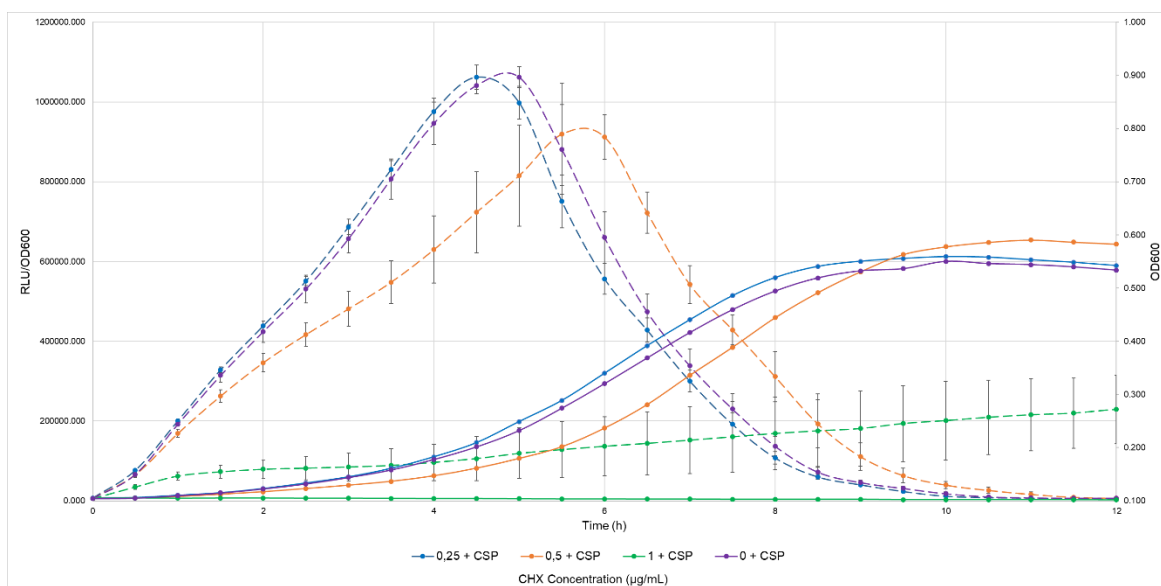
Gráfico 2 - Eficiência de transformação bacteriana (%) em diferentes concentrações de CHX em três diferentes tempos.

Os resultados a seguir são referentes as cepas SM074 [*Streptococcus mutans* $\Delta comC$ $\Phi(PsigXluc)$], cepa que possui repórter de luciferase acoplado ao gene *sigX* e que não é capaz de produzir CSP e SM059 [*Streptococcus mutans* $\Phi(PcipBluc)$], cepa com repórter de luciferase acoplada ao gene *cipB*.



Expressão do *sigX* (RLU/OD₆₀₀) (curva hachuradas) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) (curvas inteiras) da cepa SM074 em diferentes concentrações de CHX durante 12 h (média $\pm$ DP, n=3).

Gráfico 3 - Expressão do gene *sigX* normalizada pela densidade óptica da cultura de microrganismos (RLU/OD₆₀₀) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) em diferentes concentrações de CHX ao longo do tempo em meio TSB.

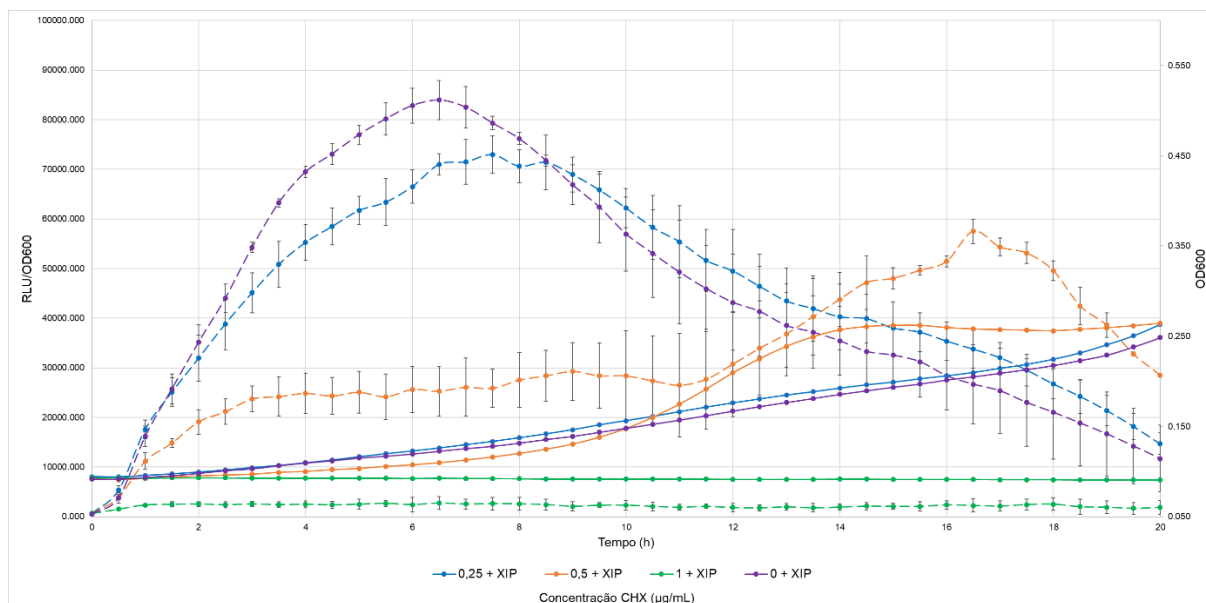


Expressão do *cipB* (RLU/OD₆₀₀) (curva hachuradas) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) (curvas inteiras) da cepa SM059 em diferentes concentrações de CHX durante 12 h (média $\pm$ DP, n=3). O controle negativo (sem CHX e sem CSP) foi removido para melhor visualização.

Gráfico 4 - Expressão do gene *cipB* normalizada pela densidade óptica da cultura de microrganismos (RLU/OD₆₀₀) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) em diferentes concentrações de CHX ao longo do tempo em meio TSB.

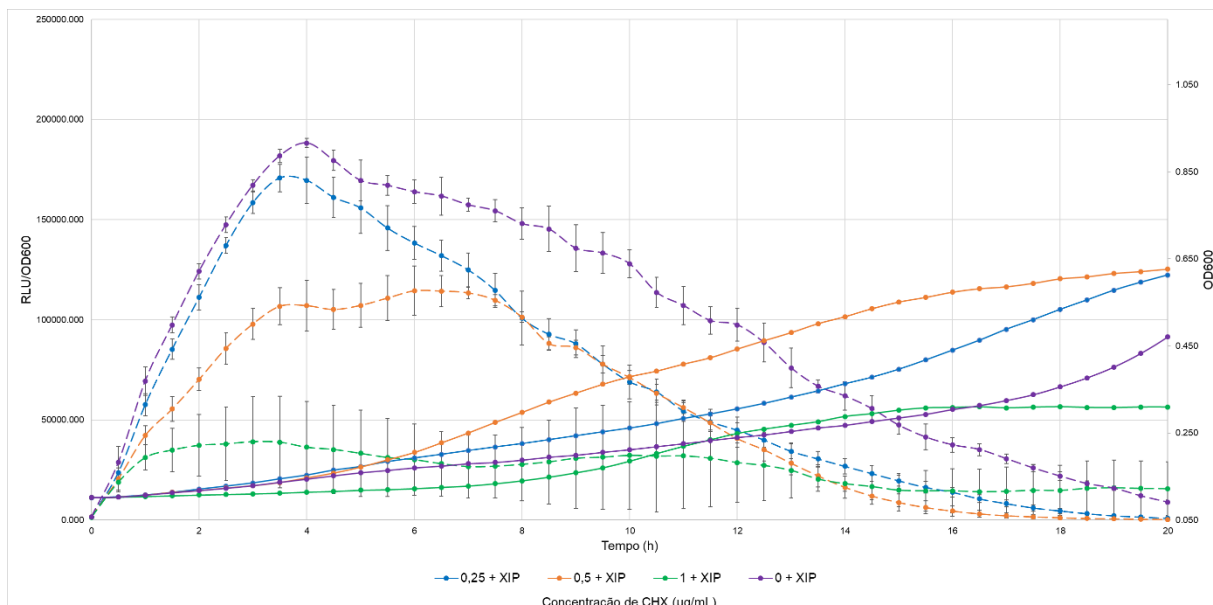
5.2 Expressão gênica em CDM + XIP

Os resultados a seguir são referentes as cepas: SM068 [*Streptococcus mutans* $\Phi(P_{sigX}luc)$], cepa que possui repórter de luciferase acoplado ao gene sigX e possui produção interna de XIP; SM091 [*Streptococcus mutans* $\Delta comS \Phi(P_{sigX}luc)$], que também possui repórter acoplado ao gene sigX mas não possui produção interna de XIP e SM112 [*Streptococcus mutans* $\Phi(P_{comS}luc)$], que possui repórter acoplado ao gene comS, responsável pela produção de XIP



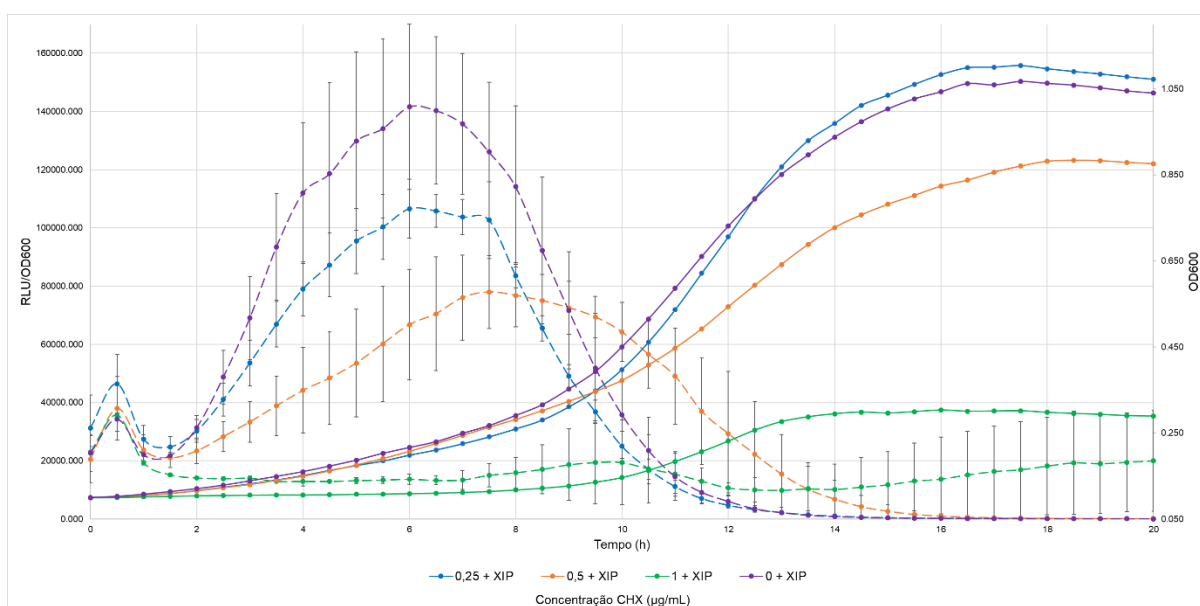
Expressão do *sigX* (RLU/OD₆₀₀) (curva hachuradas) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) (curvas inteiras) na cepa SM068 em diferentes concentrações de CHX durante 20 h (média $\pm$ DP, n=3). O controle negativo (sem CHX e sem XIP) foi removido para melhor visualização.

Gráfico 5 - Expressão do gene *sigX* normalizada pela densidade óptica da cultura de microrganismos (RLU/OD₆₀₀) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) em diferentes concentrações de CHX ao longo do tempo em meio CDM.



Expressão do *sigX* (RLU/OD₆₀₀) (curva hachuradas) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) (curvas inteiras) da cepa SM091 em diferentes concentrações de CHX durante 20 h (média ± DP, n=3). O controle negativo (sem CHX e sem XIP) foi removido para melhor visualização.

Gráfico 6 - Expressão do gene *sigX* normalizada pela densidade óptica da cultura de microrganismos (RLU/OD₆₀₀) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) em diferentes concentrações de CHX ao longo do tempo em meio CDM.



Expressão do *comS* (RLU/OD₆₀₀) (curva hachuradas) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) (curvas inteiras) da cepa SM112 em diferentes concentrações de CHX durante 20 h (média ± DP, n=3). O controle negativo (sem CHX e sem XIP) foi removido para melhor visualização.

Gráfico 7 - Expressão do gene *comS* normalizada pela densidade óptica da cultura de microrganismos (RLU/OD₆₀₀) e curva de crescimento bacteriano (OD₆₀₀) em diferentes concentrações de CHX ao longo do tempo em meio CDM.

6 DISCUSSÃO

Como é possível observar no gráfico 1, houve uma redução da expressão do *sigX* com a adição de digluconato de clorexidina em concentrações bacteriostáticas, redução que foi confirmada analisando a área sob a curva (AUC) da tabela 1. Tal redução refletiu-se também na redução da capacidade de transformação bacteriana: Quanto maior a concentração de clorexidina, menor foi a capacidade da bactéria de captar o cassete de resistência que foi adicionado ao meio.

Isso significa, em termos práticos, que quando a clorexidina está presente em concentrações bacteriostáticas, dentro dos parâmetros utilizados, o *S. mutans* possui uma menor capacidade de transferência genética horizontal. Esse efeito inibitório da clorexidina na expressão do *sigX* foi observado em todas as cepas utilizadas, tanto a que possui produção interna de CSP e XIP, quanto nas cepas com deleção dos genes *comC* e *comS*, que não produzem CSP e XIP, respectivamente. O efeito inibitório não foi observado unicamente na expressão do *sigX*, mas também em outros genes relacionados à competência como o *cipB*, gene responsável pela produção de bacteriocinas e o *comS*, gene que codifica a molécula de CSP.

Essa inibição em todo o maquinário da competência bacteriana leva a crer que a clorexidina, de alguma maneira, durante sua atuação na membrana fosfolipídica, impede que os peptídeos estimuladores da competência exerçam sua função. Não é possível afirmar com certeza se a clorexidina age de forma específica: impedindo que o CSP se ligue à *comD*; impossibilitando a passagem do XIP pelas proteínas de membrana ou até mesmo bloqueando a exportação dos mesmos, ou se ela age de maneira não específica, onde a própria lise da membrana fosfolipídica causada por ela impede que os peptídeos ativem o mecanismo de competência.

Tal hipótese pode ser relacionada com estudos que avaliaram antibióticos com mecanismos de ação parecidos: O estudo de Sturød e colaboradores (2018), ao avaliar ampicilina, um antibiótico da classe dos beta lactâmicos, que agem em parede celular, concluiu que a mesma possui efeito inibitório tanto na expressão de *sigX* quando na eficiência de transformação bacteriana, efeito contrário ao que observado outros antibióticos com mecanismos de ação diferentes, porém do mesmo estudo, como a estreptomicina e a canamicina, por exemplo, que quando presentes aumentam a produção de proteínas com erro, o que gera um estresse no meio, aumentando a expressão do *sigX* e também eficiência de transformação (Stevens, 2011).

Contudo, não há muitos estudos que avaliam expressão gênica e eficiência de transformação juntos para efeito de comparação, e até o momento, nenhum deles havia testado essas duas variáveis com o digluconato de clorexidina.

Os resultados obtidos são muito promissores, pois isso significa que, pelo menos durante as condições testadas, a clorexidina possui um efeito positivo com relação aos mecanismos de aquisição de resistência antimicrobiana. Porém, as condições em que o trabalho foi realizado pouco se assemelham às condições reais onde a clorexidina é utilizada: Na cavidade oral, para controle químico do biofilme.

O ensaio feito foi realizado em situação extremamente controlada: Uma única cepa, em meio de cultura, com concentração de clorexidina e de peptídeos conhecida. Com esses parâmetros, a clorexidina pode ter reduzido a expressão gênica e a transformação, mas a cavidade oral é um ambiente completamente diferente e desafiador. Existem inúmeras espécies microbianas vivendo em forma de biofilme, com concentrações de peptídeos de *quorum sensing* desconhecidas, e esse cenário poderia trazer resultados completamente diferentes.

Dito isso, é desejável que sejam realizados novos estudos para a análise da expressão dos genes relacionados à competência e também análise da transformação bacteriana utilizando modelos de biofilme uni ou multiespécies.

3 CONCLUSÃO

Concentrações sub-inibitórias de digluconato de clorexidina são capazes de inibir todo o maquinário relacionado à competência em *Streptococcus mutans* sob as condições testadas, incluindo a expressão de genes chave como *sigX*, *cipB* e *comS*, o que levou à uma menor capacidade de transformação bacteriana.

REFERÊNCIAS*

- Aminov RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environ Microbiol.* 2009 Dec;11(12):2970-88. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x.
- Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A. Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria - Is There Cause for Concern? *Front Microbiol.* 2019 Mar 22;10:587. doi: 10.3389/fmicb.2019.00587.
- Desai K, Mashburn-Warren L, Federle MJ, Morrison DA. Development of competence for genetic transformation of *Streptococcus mutans* in a chemically defined medium. *J Bacteriol.* 2012 Aug;194(15):3774-80. doi: 10.1128/JB.00337-12.
- Fontaine L, Goffin P, Dubout H, Delplace B, Baulard A, Lecat-Guillet N, et al. Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci. *Mol Microbiol.* 2013 Mar;87(6):1113-32. doi: 10.1111/mmi.12157.
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol.* 2014 Mar;12(3):181-96. doi: 10.1038/nrmicro3199.
- Johnsborg O, Eldholm V, Håvarstein LS. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol.* 2007 Dec;158(10):767-78.
- Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000.* 1997 Oct;15:55-62.
- Junges R, Salvadori G, Chen T, Morrison DA, Petersen FC. Hidden Gems in the Transcriptome Maps of Competent Streptococci. *Front Mol Biosci.* 2019 Jan 4;5:116. doi: 10.3389/fmolb.2018.00116.
- Håvarstein LS, Hakenbeck R, Gaustad P. Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *J Bacteriol.* 1997 Nov;179(21):6589-94. doi: 10.1128/jb.179.21.6589-6594.1997.
- Kampf G. Acquired resistance to chlorhexidine - is it time to establish an 'antiseptic stewardship' initiative? *J Hosp Infect.* 2016 Nov;94(3):213-227. doi: 10.1016/j.jhin.2016.08.018.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

Lau PC, Sung CK, Lee JH, Morrison DA, Cvitkovitch DG. PCR ligation mutagenesis in transformable streptococci: application and efficiency. *J Microbiol Methods*. 2002 Apr;49(2):193-205.

Li YH, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *J Bacteriol*. 2001 Feb;183(3):897-908.

Morrison DA, Khan R, Junges R, Åmdal HA, Petersen FC. Genome editing by natural genetic transformation in *Streptococcus mutans*. *J Microbiol Methods*. 2015 Dec;119:134-41. doi: 10.1016/j.mimet.2015.09.023.

Khan R, Rukke HV, Ricomini Filho AP, Fimland G, Arntzen MØ, Thiede B, et al. Extracellular identification of a processed type II ComR/ComS pheromone of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2012 Aug;194(15):3781-8. doi: 10.1128/JB.00624-12

Khan R, Junges R, Åmdal HA, Chen T, Morrison DA, Petersen FC. A positive feedback loop mediated by Sigma X enhances expression of the streptococcal regulator ComR. *Sci Rep*. 2017 Jul 20;7(1):5984. doi: 10.1038/s41598-017-04768-5.

Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol 2000*. 2011 Feb;55(1):16-35. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00339.x.

Mashburn-Warren L, Morrison DA, Federle MJ. A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Mol Microbiol*. 2010 Nov;78(3):589-606. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07361.x.

Merritt J, Kreth J, Qi F, Sullivan R, Shi W. Non-disruptive, real-time analyses of the metabolic status and viability of *Streptococcus mutans* cells in response to antimicrobial treatments. *J Microbiol Methods*. 2005 May;61(2):161-70.

Petersen FC, Tao L, Scheie AA. DNA binding-uptake system: a link between cell- to-cell communication and biofilm formation. *J Bacteriol*. 2005;187(13):4392-400.

Petersen FC, Tao L, Scheie AA. DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation. *J Bacteriol*. 2005 Jul;187(13):4392-400. doi: 10.1128/JB.187.13.4392-4400.2005.

Petersen FC, Scheie AA. Natural transformation of oral streptococci. *Methods Mol Biol*. 2010;666:167-80. doi: 10.1007/978-1-60761-820-1_12.

Ricomini Filho AP, Khan R, Åmdal HA, Petersen FC (2019). Conserved pheromone production, response and degradation by *Streptococcus mutans*. *Front. Microbiol.*, 13 September 2019 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02140>.

Van der Weijden FA, Van der Sluijs E, Ciancio SG, Slot DE. Can Chemical Mouthwash Agents Achieve Plaque/Gingivitis Control? *Dent Clin North Am.* 2015 Oct;59(4):799-829. doi: 10.1016/j.cden.2015.06.002.

Sturød K, Salvadori G, Junges R, Petersen FC. Antibiotics alter the window of competence for natural transformation in streptococci. *Mol Oral Microbiol.* 2018 Oct;33(5):378-387. doi: 10.1111/omi.12240.

Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Dec 27;61(1). pii: e01162-16. doi: 10.1128/AAC.01162-16

ANEXO 1 – VERIFICAÇÃO DE ORIGINALIDADE E PREVENÇÃO DE PLÁGIO

INIBIÇÃO DA COMPETÊNCIA DE STREPTOCOCCUS MUTANS PELO DIGLUCONATO DE CLOREXIDINA

ORIGINALITY REPORT

4%

SIMILARITY INDEX

%

INTERNET SOURCES

4%

PUBLICATIONS

%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

Silva, Enio Marcos da, Daniel Hatschbach Glir, Allana Walesca Martins Castanho Gill, Allan Fernando Giovanini, Adilson Yoshio Furuse, and Carla Castiglia Gonzaga. "Effect of Chlorhexidine on Dentin Bond Strength of Two Adhesive Systems after Storage in Different Media", Brazilian Dental Journal, 2015.

Publication

1%

2

Roger Junges, Gabriela Salvadori, Tsute Chen, Donald A. Morrison, Fernanda C. Petersen. "Hidden Gems in the Transcriptome Maps of Competent Streptococci", Frontiers in Molecular Biosciences, 2019

Publication

<1%

3

Fontaine, Laetitia, Astrid Wahl, Maud Fléchar, Johann Mignolet, and Pascal Hols. "Regulation of competence for natural transformation in streptococci", Infection Genetics and Evolution, 2015.

Publication

<1%

4	Antonio Pedro Ricomini Filho, Rabia Khan, Heidi Aarø Åmdal, Fernanda C. Petersen. "Conserved Pheromone Production, Response and Degradation by Streptococcus mutans", Frontiers in Microbiology, 2019 Publication	<1 %
5	"Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight", Springer Nature, 2015 Publication	<1 %
6	Iwona B. Wenderska, Nikola Lukenda, Martha Cordova, Nathan Magarvey, Dennis G. Cvitkovitch, Dilani B. Senadheera. " A novel function for the competence inducing peptide, XIP, as a cell death effector of ", FEMS Microbiology Letters, 2012 Publication	<1 %
7	Papa Abdou Lecor, Sylvie Audrey Diop, Oumar Harouna Sall, Farimata Dieng Sarr et al. "Évaluation du débit salivaire chez les personnes vivant avec le VIH sous traitement antirétroviral", Médecine Buccale Chirurgie Buccale, 2011 Publication	<1 %
8	T A Cudd, R Castellon, S C Purinton. " Thromboxane A acts at a site perfused by the carotid vasculature to mediate cardiovascular	<1 %

and adrenocortical responses ", Canadian
Journal of Physiology and Pharmacology, 1997

Publication

-
- | | | |
|---|--|------|
| 9 | <p>Silva, Mirelle Garcia(Soares, Célia Maria de Almeida). "Captação de ferro mediada por sideróforos em Paracoccidioides spp", RIUnB, 2014.</p> <p>Publication</p> | <1 % |
|---|--|------|
-
- | | | |
|----|---|------|
| 10 | <p>Mello, SÃ©rgio Silva de, Ronaldo Soares Marques, and Renato Ãngelo Saraiva. "ComplicaÃ§Ãµes respiratÃ³rias em pacientes com paralisia cerebral submetidos Ã anestesia geral", Revista Brasileira de Anestesiologia, 2007.</p> <p>Publication</p> | <1 % |
|----|---|------|
-
- | | | |
|----|--|------|
| 11 | <p>Shields, Robert C., and Robert A. Burne. "Growth of Streptococcus mutans in Biofilms Alters Peptide Signaling at the Sub-population Level", Frontiers in Microbiology, 2016.</p> <p>Publication</p> | <1 % |
|----|--|------|
-
- | | | |
|----|---|------|
| 12 | <p>Seaton, Kinda, Sang-Joon Ahn, and Robert A. Burne. "Regulation of competence and gene expression in Streptococcus mutans by the RcrR transcriptional regulator", Molecular Oral Microbiology, 2014.</p> <p>Publication</p> | <1 % |
|----|---|------|
-

Exclude quotes	Off	Exclude matches	Off
Exclude bibliography	Off		